

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C. 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 18 April 2000 (18.04.00)	
International application No. PCT/JP99/04718	Applicant's or agent's file reference PH-695-PCT
International filing date (day/month/year) 31 August 1999 (31.08.99)	Priority date (day/month/year) 31 August 1998 (31.08.98)
Applicant TAIRA, Kazunari et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
30 March 2000 (30.03.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Diana Nissen

Telephone No.: (41-22) 338.83.38



REC'D 12 SEP 2000

WIPO

PCT

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 PH-695-PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/04718	国際出願日 (日.月.年) 31.08.99	優先日 (日.月.年) 31.08.98
国際特許分類(IPC) Int.Cl ⁷ C12N 15/00, C12N 9/00, A61K 31/00, A61K 31/70, A61K 35/76, A61K 48/00		
出願人(氏名又は名称) 工業技術院長が代表する日本国		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。

- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 30.03.00	国際予備審査報告を作成した日 07.08.00	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 富永 みどり 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4 N 9152



I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 PCT 19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

- ☐ 図面 第 _____ ページ、 図、 出願時に提出されたもの
図面 第 _____ ページ、 図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面 第 _____ ページ、 図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/[X]

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)



V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲 1-15 有
請求の範囲 無

進歩性(IS)

請求の範囲 1-15 有
請求の範囲 無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲 1-15 有
請求の範囲 無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1: Hiroaki K., et al. "Distinct roles of the co-activators p300 and CBP in retinoic-acid-induced F9-cell differentiation", Nature (May, 1998), Vol393, No. 6682, p. 284-289

文献2: Hiroaki K., et al. "Deletion of the best target site for ribozyme-mediated cleavage within a fusion gene for adenovirus E1A-associated 300kDa protein(p300) and luciferase", Nucleic Acids Research(1996), Vol. 24, No. 15, p. 3010-3016

文献3: US, 5670361, A (The Regents of the University of California)
23. 9月. 1997(23. 09. 97)(ファミリーなし)

請求の範囲 1-15

請求の範囲 1-15に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献1-3に対して新規性及び進歩性を有する。

国際調査報告で引用されたいずれの文献にも、本願の請求の範囲1に記載のヌクレオチド配列を含むリボザイムが記載されておらず、しかもその点は当業者といえども容易に想到し得ないものである。



3T
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PH-695-PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No PCT/JP99/04718	International filing date (<i>day month year</i>) 31 August 1999 (31.08.99)	Priority date (<i>day month year</i>) 31 August 1998 (31.08.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15 00, 9 00, A61K 31 00, 31 70, 35 76, 48 00		
Applicant JAPAN as represented by DIRECTOR-GENERAL OF AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY		

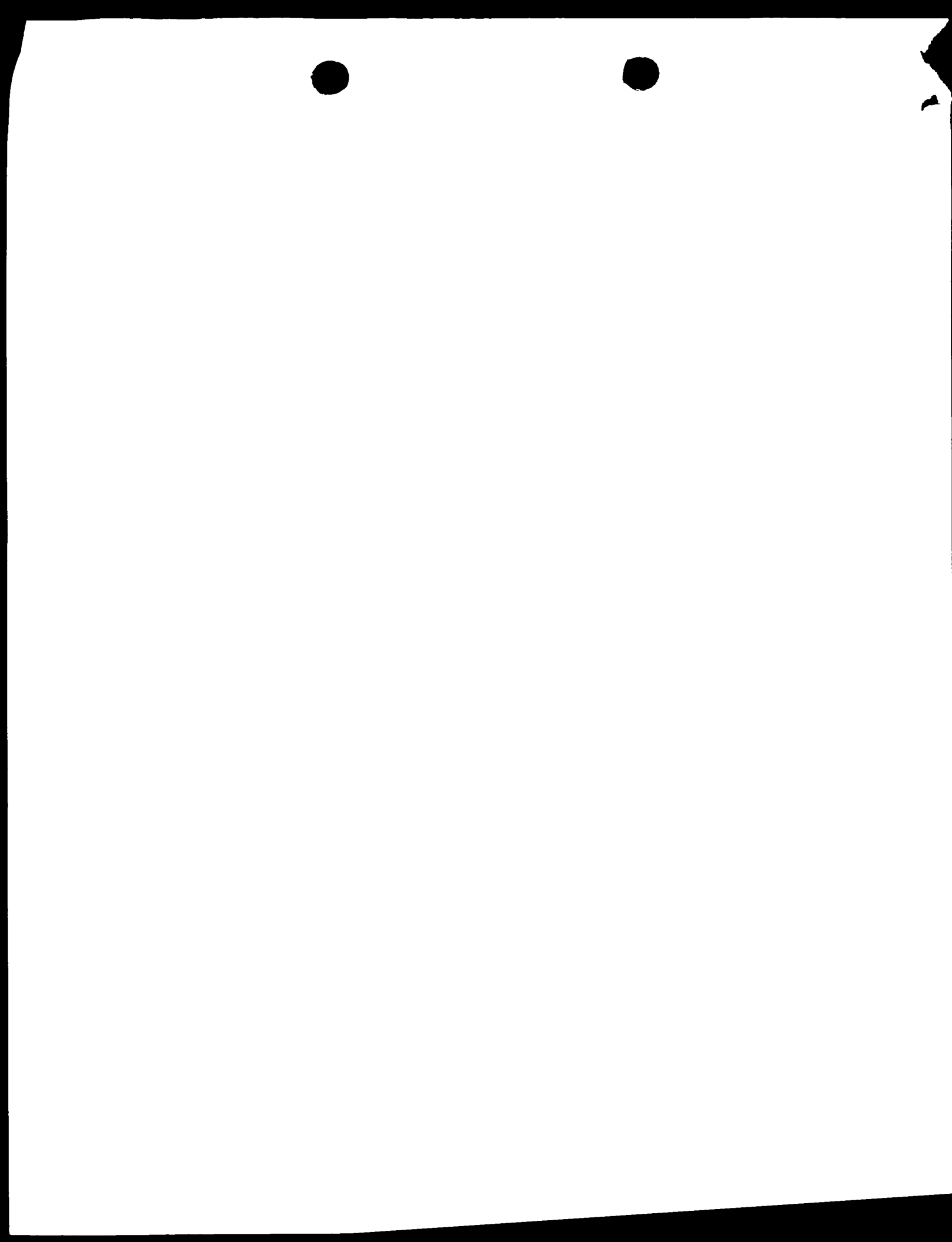
- 1 This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36
- 2 This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.
- ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

- 3 This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability, citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 30 March 2000 (30.03.00)	Date of completion of this report 07 August 2000 (07.08.2000)
Name and mailing address of the IPEA JP	Authorized officer
Facsimile No	Telephone No



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/04718

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets fig. _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)) **

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/04718

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: Hiroaki K., et al. "Distinct roles of the co-activators p300 and CBP in retinoic-acid-induced F9-cell differentiation." Nature Vol. 393, No. 6682, May 1998, pages 284 to 2889

Document 2: Hiroaki K., et al. "Detection of the best target site for ribozyme-mediated cleavage within a fusion gene for adenovirus E1A-associated 300kDa protein (p300) and luciferase." Nucleic Acids Research, Vol. 24, No. 15, 1996, pages 3010 to 3016

Document 3: U.S. 5670361, A (The Regents of the University of California) 23 September 1997 (23.09.97) (Family: none)

Claims 1-15

The inventions described in Claims 1-15 appear to be novel and appear to involve an inventive step over documents 1-3 cited in the international search report.

None of the documents cited in the international search report describes the ribozyme containing the nucleotide sequence described in Claim 1 of this application, and persons skilled in the art could not easily have conceived of this matter.





PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 PH-695-PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/04718	国際出願日 (日.月.年) 31.08.99	優先日 (日.月.年) 31.08.98
出願人(氏名又は名称) 工業技術院長が代表する日本国		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は

☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C12N 15/00, C12N 9/00, A61K 31/00, A61K 31/70, A61K 35/76, A61K 48/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C12N 15/00, C12N 9/00, A61K 31/00, A61K 31/70, A61K 35/76, A61K 48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Hiroaki K., et al. "Distinct roles of the co-activators p300 and CBP in retinoic-acid-induced F9-cell differentiation", Nature(May, 1998), Vol393, No. 6682, p. 284-289	1-15
A	Hiroaki K., et al. "Deletion of the best target site for ribozyme-mediated cleavage within a fusion gene for adenovirus E1A-associated 300kDa protein(p300) and luciferase", Nucleic Acids Research(1996), Vol. 24, No. 15, p. 3010-3016	1-15
A	US, 5670361, A (The Regents of the University of California) 23. 9月. 1997 (23. 09. 97) (ファミリーなし)	1-15

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 10. 99

国際調査報告の発送日

09.11.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり

4N

9152

電話番号 03-3581-1101 内線 3488



PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 C12N 15/00, 9/00, A61K 31/00, 31/70, 35/76, 48/00	A1	(11) 国際公開番号 WO00/12686 (43) 国際公開日 2000年3月9日 (09.03.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04718 (22) 国際出願日 1999年8月31日 (31.08.99) (30) 優先権データ 特願平10/244755 1998年8月31日 (31.08.98) (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 工業技術院長が代表する日本国(JAPAN as represented by DIRECTOR-GENERAL OF AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY)[JP/JP] 〒100-8921 東京都千代田区霞ヶ関一丁目3番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 多比良和誠(TAIRA, Kazunari)[JP/JP] 〒305-0046 茨城県つくば市東2-4-29 Ibaraki, (JP) 大川 淳(OHKAWA, Jun)[JP/JP] 〒305-0042 茨城県つくば市下広岡1055-588 B108 Ibaraki, (JP) 小関しおり(KOSEKI, Shiori)[JP/JP] 〒990-2331 山形県山形市飯田西2-2-6-405 Yamagata, (JP)	(74) 代理人 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.) 〒105-0001 東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階 Tokyo, (JP) (81) 指定国 JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書	
(54) Title: EXPRESSION SYSTEMS FOR FUNCTIONAL NUCLEIC ACID EXPRESSION		
(54) 発明の名称 機能性核酸転写発現系		
<div>5' - ACCGUUGGUUUCCGUAGUGUAGUGGUUAUCACGUUCGCCUAACACGCGAAAGGUC (I)</div> <div>CCCCGUUCGAAACCGGGCACUACAAACACAACACUGAUGAGGACCGAAAGGUCCGAAACGGGCACGUCGGA</div> <div>AACGGUUUUU-3'</div> <div>5' - ACCGUUGGUUUCCGUAGUGUAGUGGUUAUCACGUUCGCCUAACACGCGAAAGGU (II)</div> <div>CCCCGUUCGAAACCGGGCACUACAAACCAACACACAACACUGAUGAGGACCGAAAGGUCCGAAACGGGCA</div> <div>CGUCGGAACGGUUUUU-3'</div>		
(57) Abstract Ribozymes containing the base sequence (I) or nucleotide sequence (II).		

(57)要約

下記の塩基配列(I) または(II)を持つヌクレオチド配列を含むリボザイム。

塩基配列(I): 5'-ACCGUUGGUUCCGUAGUGUAGUGGUUAUCACGUUCGCCUAACACGCGAAAGGUC
CCCCGGUUCGAAACCGGGCACUACAAACACAACACUGAUGAGGACCGAAAGGUCCGAAACGGGCACGUCGGA
AACGGUUUUU-3'

塩基配列(II): 5'-ACCGUUGGUUCCGUAGUGUAGUGGUUAUCACGUUCGCCUAACACGCGAAAGGU
CCCCGGUUCGAAACCGGGCACUACAAACCAACACACAACACUGAUGAGGACCGAAAGGUCCGAAACGGGCA
CGUCGGAACGGUUUUU-3'

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦
AL アルバニア
AM アルメニア
AT オーストラリア
AU オーストラリア
AZ アゼルバイジャン
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ
BB バルバドス
BE ベルギー
BF ブルキナ・ファソ
BG ブルガリア
BJ ベナン
BR ブラジル
BY ベラルーシ
CA カナダ
CF 中央アフリカ
CG コンゴ
CH スイス
CI コートジボアール
CM カメルーン
CN 中国
CR コスタ・リカ
CU キューバ
CY キプロス
CZ チェコ
DE ドイツ
DK デンマーク

DM ドミニカ
EE エストニア
ES スペイン
FI フィンランド
FR フランス
GA ガボン
GB 英国
GD グレナダ
GE ジョージア
GH ガーナ
GM ガンビア
GN ギニア
GW ギニア・ビサウ
GR ギリシャ
HR クロアチア
HU ハンガリー
ID インドネシア
IE アイルランド
IL イスラエル
IN インド
IS アイスランド
IT イタリア
JP 日本
KE ケニア
KG キルギスタン
KP 朝鮮
KR 韓国

KZ カザフスタン
LC セントルシア
LI セリヒ・ラング
LK スリランカ
LR リベリア
LS レソト
LT リトアニア
LU ルクセンブルグ
LV ラトヴィア
MA モロッコ
MC モナコ
MD モルドヴァ
MG マダガスカル
MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア
共和国
ML マリ
MN モンゴル
MR モリタニア
MW マラウイ
MX メキシコ
NE ニジェール
NL オランダ
NO ノルウェー
NZ ニュージーランド
PL ポーランド
PT ポルトガル
RO ルーマニア

RU ロシア
SD スーダン
SE スウェーデン
SG シンガポール
SI スロベニア
SK スロヴァキア
SL シエラ・レオネ
SN セネガル
SZ スワジランド
TD チャド
TG トーゴ
TJ タジキスタン
TZ タンザニア
TM トルコ
TR トルコ
TT トリニダード・トバゴ
UG ウガンダ
UA ウクライナ
US 米国
UZ ウズベキスタン
VN ヴェトナム
YU ユーゴスラビア
ZA 南アフリカ共和国
ZW ジンバブエ

明細書

機能性核酸転写用発現系

技術分野

本発明はリボザイムおよびその発現系に関する。

背景技術

ハンマーヘッドリボザイムは、最も小さい触媒性RNA分子の1つである(Krugerら, 1982; Gruerrier-Takadaら, 1983)。このリボザイムはサイズが小さく、また抗ウイルス剤として可能性があるので、作用機構の研究(DahmおよびUhlenbech, 1991, Dahmら, 1993; EcksteinおよびLilley, 1996; Pontiusら, 1997; Lottら, 1998; Zhouら, 1996, 1997; ZhouおよびTaira, 1998)およびin vivoにおける利用を目指す研究(EricksonおよびIzant, 1992; Murray, 1992; Rossi, 1995; EcksteinおよびLilley, 1996; Prisleiら, 1997; Turner, 1997; Scanlon, 1997)が多数なされてきた。異なる生物における遺伝子発現抑制のためのリボザイムの使用を目指して成功した実験が多数報告されている(Sarverら, 1990; Dropulicら, 1992; Ojwangら, 1992; Yuら, 1993; ZhaoおよびPick, 1993; Inokuchiら, 1994; Yamadaら, 1994; Ferbeyreら, 1996; Fujitaら, 1997; Kawasakiら, 1998)。しかし、in vitroにおけるリボザイムの効力はin vivoにおける機能的活性と必ずしも相関していない。このin vivoにおける非有効性の理由のいくつかは以下の通りである。i) 細胞性タンパク質がリボザイムの標的RNAへの結合を阻害する、またはリボザイムの活性なコンホメーションを破壊する可能性がある; ii) リボザイムによって媒介される切断にとって不可欠な金属イオンの細胞内濃度が機能的活性に十分でないかもしれない; iii) リボザイムはRNaseによって容易に攻撃される。しかし、リボザイムのin vivo活性を決定するパラメーターが現在解明されつつある(BertrandおよびRossi, 1996; Bertrandら, 1997; Gebhardら, 1997)。in vivoでの研究は、効果的なリボザイム媒介遺伝子不活性化にとって以下の因子が重要であることを示唆した。すな

わち、高レベルのリボザイム発現(Yuら, 1993) ; リボザイムの細胞内安定性 (RossiおよびSarver, 1990; EcksteinおよびLilley, 1996) ; 同一細胞コンパートメント(compartment)内におけるリボザイムとその標的RNAの共局在 (SullengerおよびCech, 1993; Bertrandら, 1997); および転写されたりボザイムの切断活性 (Thompsonら, 1995)である。最近、これらの種々の特徴は、用いられた発現系に依存することがわかった(Bertrandら, 1997)。

mRNA分子の転写のために用いられるRNAポリメラーゼII (pol II)系およびtRNA、snRNA等の小さいRNA分子の転写のために用いられるポリメラーゼIII (pol III)系が、リボザイム発現系として使用されてきた(Turner, 1997)。pol IIプロモーターによって転写が開始された転写物は、コード領域の他に3'末端および5'末端に余分な配列を有する(例えば、非翻訳領域、キャップ構造、およびポリAテイル)。これらの余分な配列はin vivoにおける安定性およびmRNAとしての機能的認識に不可欠である。これらの配列が転写後トリミングされない限り、pol IIプロモーターによって転写が開始されたりボザイム配列を含む転写物は、これらの配列をすべて含んでいる(Tairaら, 1991; Ohkawaら, 1993)。その結果、ある場合には、リボザイムがその標的を認識する部位が、例えばコード配列の一部によって覆われてしまうことがある。対照的に、pol III系は短いRNA分子の発現に適しており、余分な配列は非常に短いものが生成されるのみである。さらに、発現レベルは少なくとも一桁、pol II系のそれよりも高い(CottenおよびBirnstiel, 1989)。したがって、pol III系はリボザイムの発現に非常に有用であろうと示唆された(Yuら, 1993; Perimanら, 1995)。しかし、多くの場合、pol III系の明らかに望ましい特徴にもかかわらず、リボザイムの期待される効果は達成されなかった(Ilvesら, 1996; Bertrandら, 1997)。

発明の開示

本発明者らは、pol IIIプロモーターであるtRNA^{Val}プロモーターによって転写が開始される、同一のリボザイム配列を有する3種類のリボザイムを設

計し、リボザイムの *in vivo* 活性を決定するパラメーターを検討したところ、転写物 (tRNA^{Val}プロモーターの配列が付加されたりボザイム (以下、「tRNA^{Val}-リボザイム」と称する。)) の全体的な構造がリボザイムの切断活性ばかりでなく細胞内半減期をも決定することを明らかにした。細胞核において転写されたすべてのキメラ tRNA^{Val}-リボザイムは細胞質に輸送され、かくして、リボザイムとその標的は同じ細胞コンパートメント内に存在した。このような条件下で、本発明者らは各 tRNA^{Val}-リボザイムの細胞内半減期および定常レベルが *in vivo* における機能的活性の主要な決定要素であることを見いだした。さらに、本発明者らは、*in vivo* において最長の半減期をもつように特に設計したりボザイムを発現する細胞が HIV-1 の攻撃に対してほぼ完全に耐性であることを示した。さらに、tRNA^{Val} 構造のアミノアシルステムの部分に小さなバルジ構造 (バルジとは元来 "ふくらみ" あるいは "膨張" の意で、RNA がヘアピン構造をとった場合、塩基対が組めずに 2 本鎖構造が突出している部分のことをさす。) を設けることにより、成熟酵素からの認識を回避でき、その結果、3' 側に連結されたりボザイム配列を含む任意の RNA 配列を tRNA^{Val} につながった形で細胞内に存在させることができることも見出した。本発明の tRNA^{Val} 構造の 3' 側に繋がったりボザイム配列を含む任意の RNA は、tRNA 構造の性質により、安定かつ効率よく細胞質に輸送される。このことは、特にリボザイムが細胞内で機能を有するには重要なものである。

本発明の要旨は、以下の通りである。

1. 下記の塩基配列 (I) または (II) を持つヌクレオチド配列を含むリボザイム。
 塩基配列 (I): 5'-ACCGUUGGUUCCGUAGUGUAGUGGUUAUCACGUUCGCCUAACACGCGAAAGGUC
 CCCGGUUCGAAACCGGGCACUACAAACACAACACUGAUGAGGACCGAAAGGUCCGAAACGGGCACGUCGGA
 AACGGUUUUU-3'

塩基配列 (II): 5'-ACCGUUGGUUCCGUAGUGUAGUGGUUAUCACGUUCGCCUAACACGCGAAAGGU
 CCCCUGGUUCGAAACCGGGCACUACAAACCAACACACAACACUGAUGAGGACCGAAAGGUCCGAAACGGGCA
 CGUCGGAAACGGUUUUU-3'

2. 上記 1 記載のリボザイムをコードする DNA を含む発現ベクター。

3. 上記1記載のリボザイムをコードするDNAを含む発現ベクターDNAを鋳型として、RNAに転写することを特徴とする、上記1記載のリボザイムの製造方法。

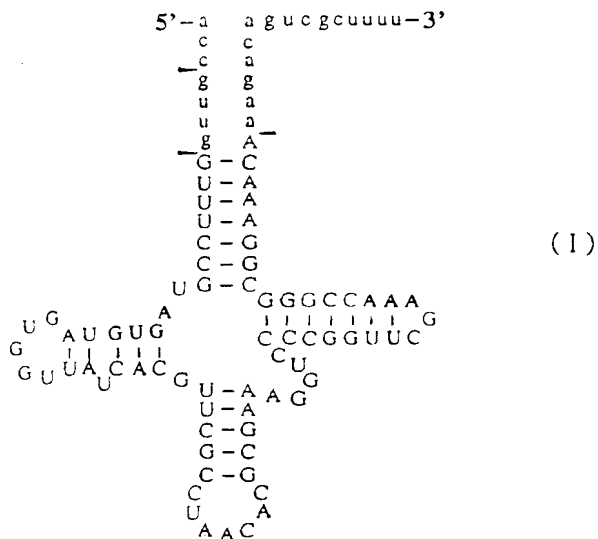
4. 上記1記載のリボザイムまたは請求項2記載の発現ベクターを有効成分として含む医薬組成物。

5. 後天性免疫不全症候群を予防および／または治療するための上記4記載の医薬組成物。

6. 上記1記載のリボザイムを用いて、標的RNAを特異的に切断する方法。

7. 標的RNAがHIV-1 RNAである上記6記載の方法。

8. 下記の二次構造(I)をとるRNA(成熟tRNA^{Val})の改変体であって、二次構造(I)をとるRNAのヌクレオチド配列のヌクレオチド8～14およびヌクレオチド73～79の間で水素結合が形成される領域にバルジ構造が導入されていることを特徴とする前記RNA改変体。



9. 二次構造(I)をとるRNAのヌクレオチド配列中のヌクレオチド73～79の領域の配列の一部または全部を置換することにより、バルジ構造が導入されている上記8記載のRNA改変体。

10. 配列番号1のヌクレオチド配列中のヌクレオチド1～80の領域の配列からなる上記8記載のRNA改変体。

WO 00/12686

1 1. 配列番号 2 のヌクレオチド配列中のヌクレオチド 1 ~ 8 6 の領域の配列からなる上記 8 記載の RNA 改変体。

1 2. 上記 8 記載の RNA 改変体の 3' 末端に任意の RNA 鎖が連結されている RNA。

1 3. 任意の RNA 鎖が、リボザイムまたはアンチセンス RNA である上記 1 2 記載の RNA。

1 4. 二次構造 (I) をとる RNA のヌクレオチド配列中のヌクレオチド 8 ~ 1 4 の領域のいずれかのヌクレオチドおよび 3' 末端に連結された RNA 鎖のいずれかのヌクレオチドによってバルジ構造が形成される上記 1 2 記載の RNA。

1 5. 上記 1 2 記載の RNA をコードする DNA を含む発現ベクター。

我々はリボザイムの転写量や安定性、転写後の活性を考慮し、その発現系として、ポリメラーゼ III 系であるヒトの tRNA^{Val} プロモーターを選択し、リボザイムとこのプロモーターとのつなぎ方によって生体内におけるリボザイム効果に差がでないかを検討した。すなわち、生体内において有意なリボザイム効果を得るために重要な要因の一つである、細胞内での安定性、及び転写後の活性に着目し、リボザイムの高次構造とこれらの要因との相関性について明らかにすることを目的とした。

まず、HIV-1 の比較的保存された配列を標的とするハンマーヘッド型リボザイムを設計し、その遺伝子を様々な配列を介して tRNA^{Val} プロモーターの下流につなぐことにより 4 種の発現系を構築した。この発現系を構築するためのベクターとしては、pUC19 (Takara) を用いたが、その他にも、pGREEN LA NTERN (ライフテックオリエンタル株式会社製)、pHaMDR (HUMAN GENE THERAPY 6:905-915 (July 1995)) などのベクターを用いてもよい。また、発現系の構築に必要なオリゴヌクレオチドは、DNA/RNA 合成機 (モデル 394; Applied Biosystems, Division of Perkin Elmer Co. (ABI), Foster City, CA) で化学合成することができる。

Zuker 法を用いた予測から、tRNA^{Val} プロモーターとハンマーヘッド型リボザイムのつなぎ目の配列の違いはリボザイムの認識部位における 2 次構造に大きな影響を与えたと考えられた (図 1 参照)。この予測図によると、全体

的なりボザイムの2次構造はどれもほぼ同じであるのに対し、基質の結合部位における自由度は大きく異なっていることがわかる。R z 1は基質結合部位の両方が分子内でステム構造を形成しているのに対し、R z 2では片方が、R z 3においては両方の結合部位がきれいにちょうど外側へ突出していることがわかる。R z 3においては突出した基質結合部位がタンパク質に覆われてしまう恐れもあるが、リボザイムはRNA酵素であり、基質との結合しやすさが、解離のしやすさと同時に活性における重要な因子となるため、リボザイムの切断能力としてはこれが一番であることが予測された。実際、細胞内において転写されたりボザイムを用いてin vitroの系において[40mM Tris-Cl (pH8.0), 8mM MgCl₂, 5mM DTT, 2mM Spermidine, 2 U/μl RNase inhibitor, 30 μg total RNA]の条件下で反応を行った。この際total RNA中に含まれるリボザイムの含有量は一定に揃えた。In vitroで転写し、放射ラベルした短い基質に対するリボザイムの活性はその認識部位における自由度に依存する結果となった(図2参照)。また、リボザイムの安定性についても検討した。対照となる遺伝子の発現量を一定に揃え、それぞれのリボザイム量を比較検討した。リボザイムの構造における違いは安定性にも影響を与えており、“なぜ全体的にはそれほど差のない構造がこのように影響するのか”理由は明らかではないが、最も安定なものとそうでないものは約25倍もの差を示した(図3B参照)。

先にも述べたように、いまだ不明であるin vitroの系におけるリボザイムの活性と生体内における効果との相関性についても次に検討した。まず、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用い、これとpNL4-3(HIV-1のクローン)の配列の融合遺伝子に対してリボザイムを作用させ、細胞抽出液内のルシフェラーゼ活性を測定することで間接的に細胞内におけるリボザイム効果を評価する系を構築した(図3A参照)。それぞれのリボザイムについて比較して結果、細胞内で安定性の最も高かったものが最も高活性を示したことから、安定性がいかに重要であるかが示唆された(図4参照)。

ここまでの話は培養細胞内においてルシフェラーゼ遺伝子とHIV-1の配列との人工的な融合遺伝子に対するリボザイム効果の評価となるので、結局の

ところ、実際の生体内における結果と等しいと判断することは困難である。そこで、実際のHIV-1に対するリボザイム効果の評価を行った(図5参照)。リボザイム発現系の形質転換体にHIV-1を感染させ、ウイルスの増殖を血清中におけるp24(ウイルスのコアタンパク)の生産量を測定したところ、我々の培養細胞内における評価と同様な傾向を示す結果が得られた。またin vitroで最も安定性の高かったリボザイムはこの場合においても非常に高い抑制効果を示し、p24の生産を99%抑えていることが明らかとなった(図6C参照)。一方、in vitroで切断活性の最も高かったリボザイム発現系はウイルスの増殖をほとんど抑制することができなかった。

このように、ウイルスでのリボザイム効果の評価も培養細胞内における人工的な基質における評価と同傾向を示していることが明らかになった。よって、今回我々が行ったような一過的な評価における結果も、生体内におけるリボザイム効果のおおよその目安になると考えられる。またin vitroからウイルスを扱った実験にわたる結果から、リボザイムの細胞内における有意な効果を得るためには活性の高さも大事であるが、それにも増して細胞内における安定性が重要であることが明らかとなった。今回のようにほとんど配列に違いのないリボザイムにおいても、発現系とのつなぎ方一つで、先に述べたような生体内における効果に大きな差が生じるという事実は、これについても十分考慮する必要がある、また発現させるために付加した配列による高次構造の影響も加味し、リボザイムに安定性を持たせるような設計が重要であることが示唆された。

tRNAは、細胞内において、その構造配列内にあるAボックスおよびBボックスと呼ばれる配列からなるプロモーター配列が認識され、5'および3'側に余分な配列がついた形で転写される。ついで、細胞内に存在する複数の成熟酵素の作用により、余分な配列が除去され成熟tRNAとなる。これらの酵素が作用するうえで、アミノアシルステムとよばれる部分の構造が、構造認識の重要な決めるの一つとなっている。我々は、この部分に小さなバルジ構造を設けることで、成熟酵素の作用から回避させることが可能であることを見出した。例えば、図1においてRz1、Rz2、Rz3はいずれもアミノアシルステムに小さなバルジ

構造を有しており、結果、転写されたRNAのリボザイム配列部分は除去されていない（図3B、7Aおよび塩基配列決定済み）。このような性質は3'側の配列がリボザイムであるからではなく、アミノアシルシステムの部分にバルジ構造があるためであり、従って、アンチセンスを含む任意のRNA配列であってもよい。

tRNAは通常、成熟酵素により5'および3'側の余分な配列が除去され、また、イントロンを有するものはスプライシング機構によりそれが除去され、さらに、特定の塩基が修飾を受け、加えて、その3'端に5'-CCA-3'からなる配列が付加され、また、あるものは、そのtRNAに適合するアミノ酸が付加され（アミノアシル化）、といった一連の修飾を受けて初めて核外に輸送される。しかし、本発明のtRNAはこの様な一連の修飾作用のうち、少なくとも、5'および3'側の余分な配列の除去、3'端にCCA配列の付加、およびアミノアシル化の修飾反応を受けずに、核外に積極的に輸送されている（図7A）。これは、アミノアシルシステムの部分にバルジを設けたことにより、成熟酵素による作用を受けないがためにCCA配列の付加、それに続くアミノアシル化が起こらないことに加え、全体の構造がもとのtRNAのそれと近いからであると考えられる。このことは、コンピューターを使った構造予測により、tRNA構造が崩れたもの（Rz4）は細胞質には輸送されていないことから支持される（図7C）。ここでの、核から細胞質へ輸送される性質は、3'側にあるリボザイム配列によるものではないので、当然、アンチセンスRNA等の任意のRNA配列でも同様であると考えられる。

近年アンチセンスRNAやリボザイムRNAは、細胞内で発現させた場合、その細胞内における分布が細胞質であることが、機能を発揮するためには重要であることがわかってきた。このRNAは、このRNAのみで安定なtRNA様構造を形成するため、3'端につなげたRNAの高次構造に大きな影響をおよぼさずに（3'端につなげたRNAがリボザイムやアンチセンスなどの機能性RNAの場合、非常に重要な性質である）、確実に細胞質へ移行する機能をもっている。さらに、このRNAはDNAにした場合プロモーターとして機能し、細胞の種類を選ばずかつ広い宿主域をもつ（もともとはヒト由来であるが、少なくとも哺乳動物全般で発現するであろう）。つまり、アンチセンスRNA、リボザイムRNAの発現系としては最適

で、培養細胞を用いた実験や、医学の分野で遺伝子治療用の道具として重要なものとなりうる。また、近年分子進化工学という手法で自然には存在しない機能を有するRNA分子が人為的に作製されている。これが、細胞内において特に細胞質において機能を発揮するものであれば、その発現系としても利用可能である。

本発明のtRNA^{Val}-リボザイムを用いて、標的RNA、特にHIV-1 RNAを特異的に切断することができる。

本発明のtRNA^{Val}-リボザイムは、医薬、特に、後天性免疫不全症候群を予防および／または治療するための医薬として使用することができる。例えば、本発明のtRNA^{Val}-リボザイムをリボソームに封入し、これを生体に投与して、HIVを含む細胞に取り込ませることにより、HIVの転写を阻害することができる。また、本発明のtRNA^{Val}-リボザイムをコードするDNAをウイルスなどのベクターに組み込んで、HIVを含む細胞内に導入し、該細胞内でこのベクターを発現させ、本発明のtRNA^{Val}-リボザイムを産生させることにより、HIVの転写を阻害することができる。本発明のtRNA^{Val}-リボザイムの投与は、疾病の状態の重篤度や生体の応答性などによるが、予防および／または治療の有効性が認められるまで、あるいは疾病状態の軽減が達成されるまでの期間にわたり、適当な用量、投与方法、頻度で行えばよい。

本明細書は、本願の優先権の基礎となる日本国特許出願特願平10-244755号の明細書および図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図1は、コンピュータフォールディングによって予測されたtRNA^{Val}-リボザイムの二次構造を示す。ハンマーヘッド型リボザイムの配列（太い大文字）を種々のリンカー配列を介してtRNA^{Val}配列（大文字）の下流に連結した。7塩基欠失tRNA^{Val}の内部プロモーターに対応する配列、すなわちAおよびBボックスは影を付けて囲って示してある。図A～Dは、それぞれtRNA^{Val}-リボザイム1（Rz1）、2（Rz2）、3（Rz3）および4

(Rz4)の二次構造を示す。リボザイムの認識アームを下線をつけて示す。
図Eはヒト胎盤 tRNA^{Val}の転写物の二次構造を示す。tRNAは3つの部位(矢じりのマーク)でプロセシングされ、成熟 tRNA^{Val}(大文字)を生じる。

図2は、in vitroにおける tRNA^{Val}-リボザイムによって媒介される切断を示す。パネルAは基質RNAを図式的に表す。(基質RNAはpNL432のヌクレオチド第500~711、すなわちHIV-1 RNAのU5領域に対応する。)この基質RNAは tRNA^{Val}-リボザイムによって2個の断片に切断された(5'切断産物: 70量体; 3'切断産物: 156量体)。パネルBは切断反応の結果を示すオートラジオグラムである。レーン: M - マーカー; ベクター - リボザイムをもたない tRNA^{Val}ベクター単独; Rz1 - リボザイム1; Rz2 - リボザイム2; および Rz3 - リボザイム3。

図3は、in vivoにおける tRNA^{Val}-リボザイムの安定性を示す。パネルAは、参照遺伝子の使用によりトランスフェクション効率の標準化を可能としたpUC-Rrを図式的に表す。参照遺伝子はリボザイム発現カセットの下流で発現された。2つの発現カセットにおいて、プロモーターおよびターミネーターの配列はそれぞれ同一であった。パネルBは tRNA^{Val}-リボザイムの発現の定常レベルを示す。図はリボザイムに特異的なプローブ(上)および参照遺伝子に特異的なプローブ(下)を用いたノーザンブロット分析を示す。図Cは、安定にリボザイムを導入した細胞における tRNA^{Val}-リボザイムの半減期を示す。図中、○は tRNA^{Val}-リボザイム1(Rz1)の相対量を示す。□および◇は、それぞれ tRNA^{Val}-リボザイム2(Rz2)および3(Rz3)の相対量を示す。横棒は3回のアッセイによる結果のS.E.を示す。

図4は、HeLa細胞におけるU5 LTR-ルシフェラーゼ融合遺伝子の産生抑制。パネルA。HeLa細胞における一過性発現。標的発現プラスミドおよびリボザイムをコードするpUCdt-Rzの両方を用いてHeLa細胞を同時トランスフェクションした。パネルB。安定にリボザイムを導入した細胞における一過性発現。各構築物につき、挿入遺伝子(tRNA^{Val}または tRNA^{Val}-リボザイム)の転写

物のレベルが類似している 2 つの独立したクローンを選択した。リボザイム産生 HeLa 細胞のトランスフェクションには、標的発現プラスミドのみを用いた。横棒は 5 回のアッセイによる結果の S.E. を示す。

図 5 は、HIV ベクターの図式的表示である。各 tRNA^{Val}-リボザイムのための発現カセットを、HIV-1 由来ベクター (A) の TK-neo^r のすぐ上流に位置する SalI 部位に挿入し、tRNA^{Val}-リボザイムをコードするレトロウイルスベクター HIVRibo.N (B) を得た。Ψ はパッケージングシグナルを示す。

図 6 は、安定にリボザイムを導入した H9 細胞 (CD4⁺ T 細胞) における tRNA^{Val}-リボザイム発現の定量化、および上記導入細胞における p24 産生の抑制を示す。パネル A。リボザイム導入 H9 細胞の 2 個の独立したクローン由来の RT-PCR 増幅リボザイムのサザンブロット分析の結果 (図 B に示す) の定量化。13、15 および 17 サイクル後の PCR 産物を、³²P 標識オリゴヌクレオチドプローブを用いてサザンブロッティングにより分析した。図中、四角および丸はそれぞれリボザイム 2 (Rz2) およびリボザイム 3 (Rz3) を導入した細胞を用いた結果を示す。パネル B。サザンブロッティングの結果。パネル C。HIV-1 NL432 を感染させた後、細胞を 11 日間培養した。3、7 および 11 日目に各培養物から少量の上清を調製した。HIV-1 抗原捕獲 ELISA により p24 抗原のレベルを測定した。図中、三角は tRNA^{Val}-リボザイム 1 (Rz1) の結果を示す。四角および丸はそれぞれリボザイム 2 (Rz2) およびリボザイム 3 (Rz3) の結果を示す。三角は対照細胞を用いた場合の結果を示す。

図 7 は、tRNA^{Val}-リボザイムの細胞内局在を示す。各細胞内画分由来の RNA を用いてノーザンブロット分析を実施した。リボザイム遺伝子を安定に導入した細胞 (図 4 B に結果を示す実験に用いた tRNA^{Val}-リボザイム産生 HeLa 細胞) から核 RNA および細胞質 RNA を別々に調製した。パネル A および C は、tRNA^{Val}-リボザイムに特異的な ³²P 標識プローブを用いて得た結果を示す。B および D は対照を示す。天然の U6 遺伝子の転写物に特異的なプローブを用いて、細胞質画分の汚染を調べた。

発明を実施するための最良の形態

本発明を以下の実施例によりさらに具体的に説明する。本発明の範囲は、これらの実施例に限定されることはない。

〔実施例〕

材料および方法

プラスミドの構築

各 tRNA^{Val}-リボザイムを発現するプラスミド (pUCdt-Rzシリーズ) は以下のように構築した。すなわち、ヒト胎盤 tRNA^{Val} 遺伝子 (pHtV1; Arnold ら, 1986) に由来するプロモーター領域の配列をコードするセンスおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドリンカーをアニールし、pUC19 の EcoRI/SalI 部位に連結した。オリゴヌクレオチドリンカーの配列は以下の通りであった: センス 5'-aat tca gga cta gtc ttt tag gtc aaa aag aag aag ctt tgt aac cgt tgg tt ccg tag tgt agt ggt tat cac gtt cgc cta aca cgc gaa agg tcc ccg gtt cga ag-3' (配列番号 6); アンチセンス 5'-tcg act tcg aac cgg gga cct tt c gcg tgt tag gcg aac gtg ata acc act aca cta cgg aaa cca acg gtt aca aag ctt ctt ctt ctt ttt gac cta aaa gac tag tcc tg-3' (配列番号 7)。次に、ターミネーター配列をコードするセンスおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドリンカーをアニールし、プロモーター領域の配列を含む pUC19 の NspV/SalI 部位に連結した。オリゴヌクレオチドリンカーの配列は以下の通りであった: センス 5'-cga aac cgg gca ccc ggg gaa tat aac ctc gag cgc ttt ttt t ct atc gcg tc-3' (配列番号 8); アンチセンス 5'-tcg acg cga tag aaa aa a agc gct cga ggt tat att ccc cgg gtg ccc ggt ttc-3' (配列番号 9)。得られたプラスミド (これは tRNA^{Val} の A および B ボックス、ならびにターミネーターを含んでいた) を pUCdt と名付けた。

pUCdt を鋳型とし、アッパープライマー (5'-cgc cag ggt ttc cca gtc acg ac-3') (配列番号 10) およびリボザイムとターミネーター両方の配列を含むロープライマー (Rz1, 5'-ctg cag gtc gac gcg ata gaa aaa aag cgc tcg

WO 00/12686

agg tgc ccg ttt cgt cct cac gga ctc atc agt gtt gtg tgg gtc ccc ggt tt
 c gaa ccg gga cct tt-3' (配列番号 11) ; Rz 2、5'-ctg cag gtc gac gc
 g ata gaa aaa aac cgt ttc cga cgt gcc cgt ttc ggt cct ttc ggt cct cat
 cag tgt tgt gtt tgt agt gcc cgg ttt cga acc ggg gac ctt t-3' (配列番号
 12) ; Rz 3、5'-ctg cag gtc gac gcg ata gaa aaa aac cgt ttc cga cgt
 gcc cgt ttc ggt cct cat cag tgt tgt gtg ttg gtt tgt agt gcc cgg ttt cg
 a acc ggg gac ctt t-3' (配列番号 13) を用いて、各リボザイムおよび t R
 N A^{Val}部分の配列をコードする DNA断片を PCRによって増幅した。PCR
 産物を EcoRI および SalI で消化した後、各断片を pUC19 の EcoRI/SalI 部位に
 連結し、pUCdt-Rzを得た。pUCdt および pUCdt-Rz シリーズの配列を直接ヌクレ
 オチド配列決定によって確認した。t R N A^{Val}-リボザイム遺伝子に加え参照
 遺伝子発現カセットをも含む pUC-Rr シリーズのメンバー (図 3 A 参照) は、pU
 Cdt の PvuII 断片を各 pUCdt-Rz の HincII 部位に挿入することによって構築した。
 制限酵素による消化によって挿入断片の方向を確認した。リボザイム導入 HeLa
 細胞の作製に用いた pHyg dt-Rz シリーズは、pUCdt-Rz シリーズの各 PvuII-SalI
 断片を pHyg (Yates ら, 1984) の EcoRV/SalI 部位に挿入することによって構築し
 た。オリゴヌクレオチドリンカーおよび PCR プライマーのすべては、DNA
 /RNA 合成機 (392 型; PE Applied Biosystems, Foster 市, CA) を用いて合
 成した。

組換え HIV ベクタープラスミドは以下のように構築した。すなわち、pMC1 neo
 由来の細菌性 neo^r 遺伝子カセットをコードする 2.0 kbp の BamHI 断片 (Thomas お
 よび Capecchi, 1987) を、HIV-1 由来ベクターの SalI 部位に挿入した (図 5 A ; S
 himada ら, 1991)。次に、図 5 B に示すように、t R N A^{Val}-リボザイム発現
 カセットを TK-neo^r のすぐ上流で SalI 部位にクローン化した。

細胞の培養およびトランスフェクション

HeLa および Cos 細胞は、10% (v/v) ウシ胎児血清 (FBS; Gibco BRL) および 45
 μg/ml ゲンタマイシン (Gibco BRL) を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (DME
 M; Gibco BRL, Gaithersburg, MD) で培養した。リボザイム導入細胞を選択する

ため、ハイグロマイシン B を最終濃度 300 μ g/ml で用いた。H 9 細胞は、10% ウシ胎児血清 (FCS; Gibco BRL) を添加した RPMI (Gibco BRL) で培養した。

リボフェクチン試薬 (Gibco BRL) を製造者のプロトコールにしたがって用いて、細胞をトランスフェクトした。H 9 細胞のトランスフェクションは、組換え HIV-1 ベクタープラスミド (図 5 B の HIV Rib.N) を用いて CaPO_4 共沈殿法により実施した。

R N A の調製

グアニジニウムチオシアネートフェノールクロロホルム法により全 R N A を抽出した。細胞質 R N A および核 R N A を文献 (Huang および Carmichael, 1996) に記述された通り分離した。

リボザイムの定常レベルおよび半減期の測定

各リボザイムの定常レベルの測定は以下のように実施した。すなわち、各 pUC-Rr を用いて HeLa 細胞 (1×10^6 細胞/10 cm プレート) をトランスフェクトした。トランスフェクションの 2 日後に、これらの細胞から全 R N A を単離した。単離された全 R N A の t R N A^{Val}-リボザイムの下流に位置する対照 R N A の量を、対照 R N A に特異的なプローブ (5'-aaa tgc cta taa aaa gcg ctc gag gt t atg ctc ccc ggg t-3') (配列番号 14) を用いたノーザンブロット分析でまず定量した。各サンプル中の対照 R N A の量を一定値に維持した。また、全 R N A のレベルも、必要であればトランスフェクトされていない HeLa 細胞から単離した R N A を添加することにより一定に保った。最後に、リボザイムに特異的なプローブ (5'-ctc atc tgt gtt gtg t-3') (配列番号 15) または対照 R N A に特異的なプローブを用いてハイブリダイゼーションを繰り返した (図 3 B)。

各リボザイムの半減期は、細胞を文献 (Huang および Carmichael, 1996) に記述された通りアクチノマイシン D で処理した後、ノーザンブロット分析によって測定した。すなわち、細胞をアクチノマイシン D に最終濃度 5 μ l/ml で 0、60、120 または 180 分間さらし、各時点で全 R N A を単離した (図 3 C)。単離された R N A の各調製物中のリボザイムの量をノーザンブロット分析により測定

した。

切断アッセイ

各pUCdt-RzまたはpUCdtによってトランスフェクトされたHeLa細胞から全RNAを抽出した。単離されたRNAの各調製物中のリボザイムの量を、リボザイムに特異的なプローブを用いたノーザンブロッティングにより測定した。次に、トランスフェクトされていないHeLa細胞から単離したRNAを添加することにより各リボザイムの濃度を同じ値になるように調節した。HIV-1のU5 LTR領域をコードする基質RNA (図2A) をT7転写によって調製し、 ^{32}P を用いて放射標識した。50 μl の反応混合物[40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 8 mM MgCl_2 , 5 mM ジチオトレイトール (DTT)、2 mM スペルミジン、40 Uの胎盤RNaseインヒビター、30 μl の全RNA、5 kpcの放射標識した基質RNA] 中で37°Cで12時間切断反応を進行させた。6%ポリアクリルアミド/7 M尿素ゲルを用いた電気泳動にかけて反応生成物を同定した (図2B)。

ルシフェラーゼアッセイ

Dual-Luciferase™ Reporter Assay System (Promega, Madison, WI)を製造者のプロトコールにしたがって用いて、ルシフェラーゼ活性を測定した。pUCdt-Rzおよび標的発現プラスミドによってトランスフェクトされたHeLa細胞 (図4A)、または標的発現プラスミドによって形質導入されたりリボザイム産生HeLa細胞 (図4B) を150 μl の1x 受動溶解緩衝液中で15分間溶解し、プレートからこすり取った。遠心分離によって細胞破砕物を除去した。20 μl の遠心分離した溶解物を100 μl のルシフェラーゼアッセイ試薬IIに添加した後、発光計 (luminometer) (Luminant LB 9501; Berthold, Bad Wildbad, Germany)を用いて発光シグナルを直ちに定量化した。さらに、ホタルルシフェラーゼの活性を標準化するため、我々はホタルルシフェラーゼによって触媒された反応の定量化の直後に100 μl のStop & Glo™試薬をサンプルチューブに加えることによって、ウミシイタケ (Renilla) ルシフェラーゼによって生成された発光シグナルを測定した。ウミシイタケルシフェラーゼの活性を参照して、ホタルルシフェラーゼ活性の記録された数値を標準化した (図4)。

ホタルルシフェラーゼ活性の標準化した各数値を、溶解物中のタンパク質濃度を参照してさらに標準化した。タンパク質はブラドフォード法 (Bradford's method) に基づく Protein Assay Kit (Bio-Rad, California, USA) を用いて定量した。

リボザイムを安定に導入されたHeLa細胞

pHyg dt または pHyg dt-Rz シリーズのメンバーを用いて HeLa 細胞をトランスフェクトし、300 $\mu\text{g/ml}$ のハイグロマイシン B (和光純薬、大阪、日本) を含有する DMEM 中で選択することにより、リボザイム導入細胞を得た。トランスフェクションの12時間後に培地を増殖培地と交換し、細胞をさらに48時間培養した。細胞を1:5の希釈で、300 $\mu\text{g/ml}$ のハイグロマイシン B を含有する DMEM (選択培地) で継代培養した。培地は3日ごとに新鮮な培地と交換した。ハイグロマイシン B に耐性な細胞を、250 $\mu\text{g/ml}$ のハイグロマイシン B を含有する DMEM 中で増殖させた。

ウイルスの作製および HIV ベクターによるリボザイムの導入

組換えウイルスを含む上清を文献 (Shimada, 1991) に記述されるように作製した。すなわち、Cos細胞 (2×10^6 細胞/10 cmの皿) を培養し、10 μg のパッケージングベクタープラスミドおよび10 μg の組換え HIV ベクタープラスミド (図 5 B に示す HIVRib.N) を用いてトランスフェクトした。48時間後に組換えウイルスを含む上清を採取し、孔径 0.22 μm のフィルターで濾過した。次に、 2×10^6 個の H 9 細胞を、6 $\mu\text{g/ml}$ の Polybrene™ (Abbott Laboratories) を含む濾過した上清 5 ml と共にインキュベートした。24時間後、培地を 10% FCS および 1 mg/ml G418 を添加した RPMI と交換した。細胞をさらに48時間培養し、G418 耐性クローンを単離した。RT-PCR 分析によってリボザイム遺伝子の導入を確認した。

H 9 細胞中に産生された tRNA^{Val}-リボザイムの定量

以下のように定量的 RT-PCR を実施した (Ozawa ら, 1990; Hamblet および Castora, 1995)。すなわち、リボザイムを安定に導入した H 9 細胞から全 RNA を抽出した。20 μl の反応混合物 [1 μg の全 RNA、20 mM Tris-HCl (pH 8.3)、

50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM dNTP, 1 pmolのプライマー (β アクチン用: 5'-gtg gcc atc tct tgc tgc aa-3' (配列番号 16); リボザイム用: 5'-gac ctt tgc gtc ctc atc-3' (配列番号 17)) および 0.25 U/ml モロニーマウス白血球ウイルス RTase (宝酒造、京都、日本)] 中で 42°C で 30 分間 cDNA を合成した。

2 個のオリゴヌクレオチドプライマー (アッパー: 5'-gac tac ctc atg aag atc ct-3' (配列番号 18); ロアー: 5'-gtg gcc atc tct tgc tgc aa-3' (配列番号 19)) を用いた PCR により β アクチンの cDNA を増幅した。PCR サイクルは、94°C 1 分間、60°C 1 分間および 72°C 2 分間を 13、15 または 17 サイクル実施した。2 個のオリゴヌクレオチドプライマー (アッパー: 5'-gtt atc acg ttc gcc taa-3' (配列番号 20); ロアー: 5'-gac ctt tgc gtc ctc atc -3' (配列番号 21)) を用いた PCR により リボザイム cDNA を増幅した。PCR サイクルは、94°C 1 分間、55°C 1 分間および 72°C 2 分間を 13、15 または 17 サイクル実施した。

13、15 および 17 サイクル後の PCR 産物を、リボザイムに特異的 (5'-acg cga aag gtc ccc ggt-3' (配列番号 22)) または β アクチンに特異的 (5'-gcg gga aaa tgc tgc gtg a-3' (配列番号 23)) な放射標識プローブを用いたサザンブロッティングにより分析した。BAS2000 システム (富士フィルム、東京、日本) を用いて各バンドの放射能 (図 6 A および 6 B) を測定した。

HIV-1 チャレンジアッセイ

HIV ベクター (HIV Rib.N) を用いてリボザイムを導入した H9 細胞およびモックを導入した対照細胞を NL432 と共に m.o.i (感染多重度) 0.01 で 4 時間インキュベートした。PBS で 2 回洗浄した後、これらの細胞を 1x10⁵ 細胞/ml の密度で、10% FCS を添加した RPMI 1640 培地で培養した。ウイルス感染後 3、7 および 11 日目に上清を回収した。HIV-1 抗原捕獲 ELISA テストキット (DAINABOT、東京、日本) を製造者の指示にしたがって用いて、各上清における HIV-1 の p24 抗原のレベルを測定した。

結果

tRNA^{Val}-リボザイムの二次構造およびin vitroにおけるそれらの切断活性

pol IIIによって転写が開始されるリボザイム発現カセットを構築するため、我々はHIV-1 RNAの5' リーダー配列を標的とするリボザイム配列 (Adachi ら, 1986; Yu ら, 1993) を、間に3つの短いリンカーを介して、tRNA^{Val} プロモーターに隣接してクローン化し (図1においてリンカー配列は小文字で、またリボザイム配列は太い大文字で示す)、一組のpUCdt-Rzプラスミドを得た。短いリンカーの挿入は、転写物の全体的構造を変化させ、その結果、リボザイムの認識アーム (arm) (図中、認識アームには下線を付してある) の接近しやすさ (accessibility) に影響を及ぼした。当然ながら、リボザイムが基質RNAと共にステム (stem) 構造 (これは次におこる基質の切断を確実にするものである) を形成できるように、リボザイムの5' 側および3' 側基質認識部位の両方が基質に対して利用可能であることが重要である。構造と機能的活性の関係を明らかにするため、我々は認識アームの利用可能性 (availability) の程度を変更するリンカーを選択した。図1はコンピュータモデリング (Mfold Biocomputing Office, Biology Department, Indiana University, IN, USA) によって予測されるtRNA^{Val}-リボザイムの二次構造 (AおよびBボックスに対応する配列に影をつけてある) を示す。ある場合においては (図1A)、ターミネーター配列の前にリンカーが挿入され、リボザイムの3' 側基質認識アームのフレキシビリティを制限した。さらに、5' 側基質認識アームは利用不可能であった。したがってtRNA^{Val}-リボザイム1 (図1AのRz1) の場合は、5' 側および3' 側基質認識アームの両方は殆どらせん構造中に埋没していた。tRNA^{Val}-リボザイム2 (Rz2) は、5' 側に制限された1つの基質認識アームを有する。対照的に、tRNA^{Val}-リボザイム3 (Rz3) は制限された基質認識アームを全くもたず、両方のアームとも基質との結合に利用可能であった。基質認識アームのフレキシビリティから判断すると、Rz3の切断活性が最も高く、次にRz2およびRz3がこの順番で続くと予想されよう。なお、Rz1~3の塩基配列は、それぞれ、配列表の配列番号3、1、および2に示す。

上記リボザイムがそれらの二次構造（図1）から予想される通りの切断活性を有するかどうかを調べるため、我々はまずin vitroにおける活性を比較した。上記リボザイム（tRNA^{Val}-リボザイム）をコードする種々のpUCdt-Rzプラスミドを用いてトランスフェクトしたHeLa細胞から全RNAを単離した。我々は単離したRNA中の各リボザイムの一定量（ノーザンブロット分析データに基づく）を放射標識した基質RNAと混合し、切断反応を開始させた。12時間インキュベートした後、6%ポリアクリルアミド/7 M尿素を含むゲルを用いて各反応の進行をモニターした（図2）。予想した通り、両方の認識アームが利用可能であるRz3の切断活性が最も高く、次にRz2が続き、他方、両方の認識アームが利用できないRz1の切断活性は非常に低かった。したがって、in vitroにおけるtRNA^{Val}-リボザイムの切断活性は、コンピュータによって作製されたそれらの二次構造から推定できることが明らかであった。

tRNA^{Val}-リボザイムの定常レベルおよび半減期

我々はリンカー配列の介在によって全体的な構造に小さい変化が生じるであろうと予想した。したがって、リンカーはリボザイムのin vivoにおける安定性にかなりの影響を及ぼすに相違ない。我々は2つの異なるアプローチを用いて、各tRNA^{Val}-リボザイムの細胞内安定性を下記のように比較した。すなわち、pUC-Rr（リボザイムをコードする各pUCdt-Rzプラスミドに参照遺伝子の配列を付加してpUC-Rrを作製した；図3A）を用いて一過性にトランスフェクトしたHeLa細胞由来の各転写物の定常レベルをノーザンブロット分析（一過性発現アッセイ）により比較した。参照遺伝子の転写量を調整することにより各tRNA^{Val}-リボザイムの発現レベルを標準化した。参照遺伝子は同じプラスミド内にタンドムに連結した（pUC-Rr；図3A）。tRNA^{Val}-リボザイムをコードする各プラスミドを用いてトランスフェクトしたHeLa細胞から我々が単離したRNAの全サンプル中に、長さが約150ヌクレオチド（これはキメラtRNA^{Val}-リボザイムの大きさと一致する）の転写物が検出された。tRNA^{Val}-リボザイムの定常レベルは、濃度が30倍の範囲で異なっていた。最も高かったRz2のレベルは最も低いRz1のレベルの約26倍であった。そして、Rz3のレベ

ルは R z 1 のレベルの約 5 倍であった。各リボザイム発現カセットのプロモーター領域には何の改変もしていないので各場合において転写効率は同一であると推定されるため、我々は転写物の定常レベルにおけるこれらの差は各転写物の *in vivo* における安定性の結果であると仮定した。

第 2 のアプローチとして、また上記の仮説を試験するため、我々はより自然な細胞内条件下で各転写物の安定性を比較しようと試みた。我々は、各 tRNA^{Val}-リボザイムを産生する安定した HeLa 形質転換細胞を確立し、そしてアクチノマイシン D を用いて細胞性転写を妨げることによって各転写物の細胞内半減期を直接測定した。図 3 C に示すように、R z 2 の分解速度は R z 1 および R z 3 のそれよりも低かった。R z 2 の半減期 (100±10 分) は、R z 1 (35±2 分) および R z 3 (40±15 分) の 2 倍以上であった。これらの結果は一過性発現アッセイの結果と良く一致しており、転写物の定常レベルにおける差は転写効率における何らかの差によるよりも、むしろ各転写物の *in vivo* における安定性による、という我々の仮説を支持した。

tRNA^{Val}-リボザイムの細胞内活性

tRNA^{Val}-リボザイムの細胞内活性を評価するため、我々は 2 種類のアッセイを実施した。第 1 に、各 tRNA^{Val}-リボザイム発現プラスミド (pUCdt-Rz) および HIV-1 LTR (R-U5 領域)-ルシフェラーゼからなるキメラ遺伝子をコードする標的遺伝子発現プラスミドを用いて HeLa 細胞を同時トランスフェクションした。両遺伝子の一過性発現の後、各細胞溶解物においてルシフェラーゼ活性を測定することにより各 tRNA^{Val}-リボザイムの細胞内活性を評価した。リボザイム発現プラスミドの代わりに最小限の tRNA^{Val} プロモーターおよびターミネーター配列を有する対照プラスミド (pUCdt) を用いた場合に記録されたルシフェラーゼ活性を 100% とした。図 4 A に示すように、*in vivo* において安定性が最も高かった R z 2 が最も効果的 (>60% 抑制) であり、R z 3 が次に効果的 (>40% 抑制) であった。R z 1 は、*in vitro* における低い切断活性 (図 2 B) および *in vivo* における低い安定性 (図 3 B および 3 C) から予測されるように、非常に効果的とは言えなかった (約 10% 抑制)。

第2のアッセイにおいては、標的遺伝子発現プラスミドのみを用いて、ほぼ同一レベルのtRNA^{Val}-リボザイムを発現する安定した形質転換細胞をトランスフェクトした（安定した形質転換HeLa細胞を恣意的にピックアップし、リボザイムをほぼ同一レベルで発現するクローンを試験用を選択した）。各リボザイムに対して2つの独立した、安定な形質転換体を用いたこの実験において（図4B）、我々は上の段落に記述した傾向に類似した傾向を観察した。しかし、この場合は、おそらく形質転換HeLa細胞がtRNA^{Val}-リボザイムを構成的に産生したため、すべてのリボザイムの効果はより強かった。Rz2は標的遺伝子の発現を有意なレベルまで抑制し、ある場合には97%も抑制した。

Rz3はin vitroにおける切断活性が最も高かったが、細胞環境内ではRz2より効果的に作用することはなかった。これらの結果は、もし転写されたりリボザイムが細胞内で十分安定であるならば、極めて高い切断活性がなくてもin vivoにおいて顕著な効果をもたらすことを示唆する。

HIV-1の複製を抑制する能力

上記の試験は、Rz2およびRz3がin vivoにおいてHIV-1の配列に対して有意な切断活性をもつかも示したので、我々はHIV-1の複製を抑制するtRNA^{Val}-リボザイムの能力を比較した。すなわち、HIVベクター

（図5；Shimadaら，1991）を用いて、Rz2またはRz3を発現するH9細胞系の安定な形質転換体を得た（上記の試験においてRz1は不活性だったので、Rz1を産生する安定な形質転換体を単離する試みは行なわなかった）。HIVベクターによって形質導入された、リボザイム発現カセットをもたない細胞（図5A）をモック対照として用いた。以下の分析には2つの独立した細胞系を用いた。その結果、11日間にわたって、リボザイムを産生しない細胞の増殖速度（データはここに示していない）と比べ、それら細胞系の増殖速度に何ら明白な変化は検出されなかった。したがってリボザイムは宿主細胞にとって有害ではなく、おそらく高い特異性をもって標的RNAのみを切断したのであろう（Kawasakiら，1996，1998）。

ウイルスチャレンジアッセイに先立って、我々は定量的RT-PCR分析により形

質導入H9細胞における各tRNA^{Val}-リボザイムの定常レベルを測定した。図3Bに示すHeLa細胞を用いた一過性発現アッセイの結果、すなわち、Rz2とRz3の定常レベルの差は約5倍であるということが、RT-PCR分析により確認された(図6Aおよび6B)。明らかにRz2は*in vivo*においてRz3よりも安定であった。

tRNA^{Val}-リボザイムを構成的に産生する安定なH9形質転換体をHIV-1ピリオンを用いてチャレンジし、感染の11日後に測定するとRz2は殆ど完全にウイルスの複製を抑制した(約99%)(図6C)。対照的に、驚くべきことに、Rz3はこれらの実験条件下でウイルスの複製を全く抑制しなかった。HIV-1チャレンジアッセイにおいては、Rz2とRz3の効果の差は顕著であった。

tRNA^{Val}-リボザイムの細胞内局在

リボザイムがその標的と共局在することがリボザイム効果の明らかに重要な決定要素であるので(SullengerおよびCech, 1993; Bertrandら, 1997)、tRNA^{Val}-リボザイムの細胞内局在を確認することが不可欠であった。Rz2発現カセットによって形質導入されたHeLa細胞由来の全RNAを核画分および細胞質画分に分離した。次に、リボザイムに特異的なプローブを用いてノーザンブロット分析により転写されたRz2を検出した。図7Aに示すように、Rz2は主として細胞質画分に見いだされた。そして、核画分では有意なレベルで検出されなかった。他のtRNA^{Val}-リボザイム(Rz1およびRz3)もまた細胞質画分に主として局在していた(データはここに示していない)。核内に残留するU6 snRNAは対照としてこれらの試験に含めた(図7B)。

考察

リボザイムは特定の遺伝子の発現を抑制するための、可能性のある有用な道具である。なぜなら、リボザイムは高い特異性をもって他のRNA分子に作用するように作製できるからである(Uhlenbeck, 1987; HasseloffおよびGerlach, 1988)。多数の試みが成功をおさめたが(EcksteinおよびLilley, 1996; Turner, 1997; Scaloni, 1997)、*in vivo*において使用できる効果的なリボザイム発現系を設計することは依然として困難である。治療剤または遺伝子的作用物質とし

てのリボザイムおよびアンチセンスRNAの使用に関連する1つの主要な挑戦は、適切な発現ベクターの開発である (JenningsおよびMolloy, 1987; Sullengerら, 1990; Bertrandら, 1994, 1997; Thompsonら, 1995)。序論に述べたように、今日まで2種類の発現系、すなわちpol II系およびpol III系が用いられてきた。本研究において、我々はpol III系およびリボザイムの転写のためにヒト tRNA^{Val} 遺伝子のプロモーター (Yuら, 1993) を用いた。このプロモーターは小さいRNA分子の転写に適しているばかりでなく、その使用はコンピュータフォールディング (folding) による二次構造の予測を容易にする。より重要なことに、それは転写されたリボザイムの核から細胞質への輸送を可能とし、その結果 tRNA^{Val}-リボザイムは標的 mRNA を見つけることができるのである。

発現カセットの設計

標的 mRNA の二次構造は、リボザイムによって媒介される切断を受けやすいかどうかを決定する。そして、リボザイムもまた最大活性を得るためには適切な二次および三次構造に折り畳まれなければならない。コンピュータが予測する二次構造が転写後の対応する構造を本当に表しているという保証は全くないが、本研究において予測された構造 (図 1 A ~ 1 C) は、in vitro における切断活性と良く相関していた (図 2)。発現カセットにおいては、転写物の 3' 末端プロセッシングをブロックするため、成熟 tRNA^{Val} (図 1 E に大文字で示す) の最後の 7 個の塩基が除去されたが転写に何ら影響はなかった (Adeniyi-Jonesら, 1984)。これらの塩基をリンカー (図 1 に小文字で示す) によって置換し、その後リボザイム (太い大文字) を続けた。リンカー配列によって tRNA^{Val} の配列 (全配列の約 2/3 をしめた) と組み合わせて安定なステム構造を形成することにより、基質認識アームの自由度または利用可能性を調節した。したがって、コンピュータフォールディングによって各認識アームの二次構造および接近可能性を予測することは比較的容易であった。さらに、基質認識アームの配列が変わっても、全体的二次構造を予測する同じルールを用いる限り、認識アームの接近可能性を予測することは可能である。実際、我々

は他の遺伝子の発現を抑制するための類似のリボザイム発現系の構築に成功した (Kawasakiら, 1996, 1998)。図 1 A ~ 1 C に示す我々の発現系は、効果的なリボザイム発現カセットの設計を容易にする。

tRNA^{Val}-リボザイムの核から細胞質への輸送

図 1 A ~ 1 C に示すリボザイム発現カセットは、すべての転写物が細胞質 (ここで転写物はその標的を見いだすことができる) に輸送されるのを可能とした (図 7 A)。そして、リボザイムによる標的分子の発現の有意な抑制が観察された (図 4 および 6 C)。以前の研究 (Bertrandら, 1997) において、成熟 tRNA^{Met} の最後の 10 塩基の欠失は 3' 末端プロセッシングをブロックしただけでなく、転写物の細胞質への輸送を阻害した (Tobianら, 1985)。これらの結果は、3' 末端プロセッシングが細胞質への輸送と結びついている可能性があること、および 3' 末端が変更された転写物は効率的に輸送されないことを示唆した (Cotten および Birnstiel, 1989; Boelensら, 1995)。しかし、図 7 に示されるように、成熟 tRNA^{Val} の最後の 7 塩基の欠失は、転写物の核からの輸送を抑制しなかった。

tRNA を核から細胞質へ輸送する Exportin(tRNA) と称するタンパク質が最近同定された (Artsら, 1998)。Exportin(tRNA) は tRNA の不在下で RanGTP と結合する。しかし、これは RanGTP の不在下では tRNA と結合しない。したがって、下記の tRNA 輸送モデルが提案された。すなわち、まず核内で Exportin(tRNA) が RanGTP と会合し、次にこの複合体が成熟した tRNA に結合するというものである。この最終的な複合体は、核膜孔複合体をへて細胞質に運ばれる。そこで Ran 結合 GTP は加水分解されて tRNA を細胞質中に放出し、Exportin(tRNA) を核にもどしてリサイクルさせる (Artsら, 1998)。Exportin(tRNA) によって認識される tRNA 中の最小配列または構造はいまだに分かっていない。しかし、図 1 A ~ 1 C に示すリボザイムは細胞質にうまく輸送されたので、天然の tRNA の 3' 末端における欠失および変更にもかかわらず、これらリボザイムが Exportin(tRNA) によって認識され、輸送されたということが考えられる。

我々の研究から、3' 末端変更 tRNA 転写物はその二次構造が図 1 A ~ 1

Cに示すものと類似しているならば、細胞質へ効率的に輸送されることが明らかである。別の種類のリボザイム（図1DのR z 4（配列番号5））をHeLa細胞で発現させようと同様の実験を行なった際、転写物は核内に残った（図7C）。転写物R z 1～R z 4においてはAおよびBボックスプロモーターエレメント（図1の影をつけてある部分）のみならず、tRNA^{Val}セグメント内の残りのすべての配列が同一であるという事実にもかかわらず、R z 4（図1D）の二次構造は細胞質リボザイムR z 1、R z 2およびR z 3のそれと全く異なっている。この観察は、もしExportin(tRNA)が実際にリボザイム転写物を認識できるのであれば、Exportin(tRNA)は特定のヌクレオチド配列を認識するのではなさそうだ、ということを示唆する。Exportin(tRNA)はむしろtRNAの何らかの特異的高次構造、またはそのような高次構造内の何らかの配列を認識するのかもしれない。

実際、別の目的のために構築した、二次構造がR z 4のそれと類似している別のリボザイムは核内にのみ見いだされた（データは示していない）。我々は別の3種類の遺伝子を抑制するために、10種類以上の別のリボザイムを構築した。構築にあたっては、それらが細胞質へ輸送されるように、二次構造を図1のR z 1からR z 3の二次構造に似たものにしようと留意し、リンカー配列を調節した。これらのリボザイムのすべては、転写後、細胞質中に見いだされた。これらは高い活性（>95%抑制）のみならず、高い特異性（不活性対照による抑制は<5%）をも有していた。したがって、図1A～1Cに示す設計に基づく細胞質リボザイムは非常に魅力的に思われる（Kawasakiら、1996、1998）。核内に残留し、活性がそれほど高くなかった RossiのtRNA^{Met}-リボザイム（Bertrandら、1997）は、リンカー配列が異なっているため、我々の活性な二次構造とは類似していないということも述べておくべきであろう。それらの構造はR z 4のそれに類似している（コンピュータによって予測された構造はここには示していない）。

R z 4または RossiのtRNA^{Met}-リボザイムのようなものではなくR z 1からR z 3のようなりボザイムがRanGTPの存在下で（すなわち、輸送受容体と

その貨物の間で複合体の形成が予想されるような条件下で)、Exportin(tRNA)と複合体を形成するかどうかを決定することは興味深いであろう (Artsら, 1998)。

in vivoにおける tRNA^{Val}-リボザイムの活性

SullengerおよびCech (1993) ならびにRossiのグループ (Bertrandら, 1997) は、リボザイムのその標的の細胞内共局在の重要性を明確に示した。1つの特定の発現カセットの場合、リボザイムとその標的RNAの両方が核内に見いだされ、そしてリボザイムによる標的の特異的切断が検出された (Bertrandら, 1994)。したがって、決定的なパラメーターはリボザイム自体の局在ではなく、むしろ標的と共局在するリボザイムの能力である (Bertrandら, 1997)。mRNAの細胞内プロセッシングおよび輸送には種々のタンパク質性因子が関与しているので、そしてそのような因子は転写直後にmRNAと迅速に結合しうるので、このような因子は核内におけるリボザイムの標的RNAとの結合を阻害しうるのであろう。また細胞質中においても、ポリソームがリボザイムの標的RNAとの結合を阻害するかもしれない。さらに、核tRNA^{Met}-リボザイムは、もとは核内で産生された細胞質mRNAを不活性化しなかったので (Bertrandら, 1997)、核から細胞質へのmRNAの輸送は核tRNA^{Met}-リボザイムによる攻撃よりもはるかに迅速であるように思われる。in vivoにおけるリボザイムの活性を決定する最も重要な因子の1つは、リボザイムとその標的との会合であると思われる。リボザイムの相当多くの部分が輸送中および標的部位への接近中に分解されるに違いない。このため、リボザイムとその標的が共局在していても、それだけではリボザイムのin vivoにおける効果を保証しない。

in vivoにおいて最も安定であったリボザイムRz2 (図3B、3C、6Aおよび6B) は、in vitroにおいてより高い切断活性を示したRz3 (図2) よりも細胞内環境においてより効果的であった (図4)。活性におけるこの差はHIV-1チャレンジにおいて拡大された (図6C)。より安定なRz2を産生する細胞はHIV-1の感染に対してほぼ完全に耐性であったが、安定性のより低いRz3を産生する他の細胞はHIV-1の感染に対して対照細胞と同程度に感受性であっ

た。R z 2 の半減期は R z 3 のその約 2 倍であったが、どの構造的特徴が R z 2 を RNase に対してより耐性に行しているのか、現在のところ不明である。R z 2 に較べて、R z 3 のリンカー内には 6 個多いヌクレオチドが含まれていた。このことが高次構造に影響を及ぼしたに相違ない。

天然の tRNA 分子の半減期は 50~60 時間であるが (Smith および Weinberg, 1981)、R z 2 の半減期は約 100 分に過ぎなかった。tRNA-リボザイムの半減期を伸ばすことができるならば、より高い抑制効果が期待できるであろう。我々は転写物の *in vivo* における相対的安定性をいまだに予測できないのであるが、図 1 に示すような二次構造を組み込むことによって細胞質に輸送されうるリボザイムを設計することは可能である。転写物の安定性を正確に予測することができないので、我々は通常数個の構築体を試験する。そして、今日までに試験した種々の遺伝子の場合、我々は興味のある遺伝子の発現を >95% の効率で不活性化できるカセットを常に得ることができた (Kawasaki ら, 1996, 1998)。

tRNA^{Val}-ベクターは、標的分子が細胞質中に局在するリボザイム以外の機能性 RNA の発現に有用でありうる。我々の掌中で、tRNA^{Val}-リボザイムは少なくとも培養細胞中では一貫して高い活性を有する。したがって適切に設計された tRNA^{Val}-リボザイムは、分子生物学における道具として、また医学分野においても役に立つ道具として有用である。

産業上の利用の可能性

本発明により、新規なリボザイムおよびその発現系が提供された。本発明のリボザイムは *in vivo* で安定性が高く、それにより高い活性を呈する。

(参考文献)

- Adachi, A., Gendelman, H. E., Koenig, S., Folks, T., Willey, R., Rabson, A. and Martin, M. A. (1986) Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J. Virol.*, 59, 284-291.
- Adeniyi-Jones, S., Romeo, P. and Zasloff, M. (1984) Generation of long read through transcripts in vivo and in vitro by deletion of 3' termination and processing sequences in the human tRNA^{met} gene. *Nucleic Acids Res.*, 12, 1101-1115.
- Arnold, G. J., Schmutzler, C., Thomann, U., van Tol, H. and Gross, H. J. (1986) The human tRNA^{Val} gene family: organization, nucleotide sequences and homologous transcription of three single-copy genes. *Gene*, 44, 287-297.
- Arts, G.-J., Fornerod, M. and Mattaj, J. W. (1998) Identification of a nuclear export receptor for tRNA. *Curr. Biol.*, 6, 305-314.
- Bertrand, E., Pictet, R. and Grange, T. (1994) Can hammerhead ribozymes be efficient tools for inactivating gene function? *Nucleic Acids Res.*, 22, 293-300.
- Bertrand, E. and Rossi, J. J. (1996) Anti-HIV therapeutic hammerhead ribozymes: targeting strategies and optimization of intracellular function. In Eckstein, F. and Lilley, D. M. J. (eds.), *Nucleic Acids Mol. Biol.*, Vol. 10. Springer-Verlag, Berlin, 301-313.
- Bertrand, E., Castanotto, D., Zhou, C., Carbonnelle, C., Lee, G. P., Chatterjee, S., Grange, T., Pictet, R., Kohn, D., Engelke, D. and Rossi, J. J. (1997) The expression cassette determined the functional activity of ribozymes in mammalian cells by controlling their intracellular localization. *RNA*, 3, 75-88.

- Boelens, W., Palacios, I. and Mattaj, J. W. (1995) Nuclear retention of RNA as a mechanism for localization. *RNA*, 1, 273-283.
- Cotten, M. and Birnstiel, M. (1989) Ribozyme mediated destruction of RNA in vivo. *EMBO J.*, 8, 3861-3866.
- Dahm, S. C. and Uhlenbeck, O. C. (1991) Role of divalent metal ions in the hammerhead RNA cleavage reaction. *Biochemistry*, 30, 9464-9469.
- Dahm, S. C., Derrick, W. B. and Uhlenbeck, O. C. (1993) Evidence for the role of solvated metal hydroxide in the hammerhead cleavage mechanism. *Biochemistry*, 32, 13040-13045.
- Dropulic, B., Lin, N. H., Martin, M. A. and Jeang, K. T. (1992) Functional characterization of a U5 ribozyme: intracellular suppression of human immunodeficiency virus type 1 expression. *J. Virol.*, 66, 1432-1441.
- Eckstein, F. and Lilley, D. M. J. (eds.) (1996) *Catalytic RNA, Nucleic Acids and Molecular Biology*, Vol. 10. Springer-Verlag, Berlin.
- Erickson, R. P. and Izant, J. (eds.) (1992) *Gene Regulation: Biology of Antisense RNA and DNA*. Raven Press, New York.
- Fefbeyre, G., Bratty, J., Chen, H. and Cedergren, R. (1996) Cell cycle arrest trans-hammerhead ribozyme action in Yeast. *J. Biol. Chem.*, 271, 19328-19323.
- Fujita, S., Koguma, T., Ohkawa, J., Moti, K., Kohda, T., Kise, H., Nishikawa, S., Iwakura, M. K. and Taira, K. (1997) Discrimination of a single base change in a ribozyme using the gene for dihydrofolate reductase as a selective marker in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 391-396.
- Gebhard, J. R., Perry, G. M., Mahadeviah, S. and Witton, J. L. (1997) Use of a nonviral vector to express a chimeric tRNA-ribozyme against lymphocytic choriomeningitis virus: cytoplasmic accumulation of a

- catalytically competent transcript but minimal antiviral effect. Antisense and Nucleic Acid Drug Dev. 7, 3-11.
- Good, P. D., Krikos, A. J., Li, S. X. L., Lee, N. S., Giver, L., Ellington, A., Zaia, J. A., Rossi, J. J. and Engelke, D. R. (1997) Expression of small, therapeutic RNAs in human cell nuclei. Gene Therapy, 4, 45-54.
- Guerrier-Takade, G., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N. and Altman, S. (1983) The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. Cell, 35, 849-857.
- Hamblet, N. S. and Castora, F. J. (1995) Mitochondrial DNA deletion analysis: a comparison of PCR quantitative methods. Biochem. Biophys. Res. Commun., 207, 839-847.
- Hasseloff, J. and Gerlach, W. L. (1988) Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. Nature, 334, 585-591.
- Huang, Y. and Carmichael, G. G. (1996) Role of polyadenylation in nucleocytoplasmic transport of mRNA. Mol. Cell. Biol., 16, 1534-1542.
- Inokuchi, Y., Yuyama, N., Hirashima, A., Nishikawa, S., Ohkawa, J., and Taira, K. (1994) A hammerhead ribozyme inhibits the proliferation of an RNA coliphage SP in E. coli. J. Biol. Chem., 269, 11361-11366.
- Ilves, H., Barske, C., Junker, U., Bohnlein, E. and Veres, G. (1996) Retroviral vectors designed for targeted expression of RNA polymerase III-driven transcripts: a comparative study. Gene, 171, 203-208.
- Jennings, P. A. and Molloy, P. L. (1987) Inhibition of SV40 replicon function by engineered antisense RNA transcribed by RNA polymerase III. EMBO J, 6, 3043-3047.
- Kawasaki, H., Ohkawa, J., Tanishige, N., Yoshinari, K., Murata, T.,

- Yokoyama, K. K. and Taira, K. (1996) Selection of the best target site for ribozyme-mediated cleavage within a fusion gene for adenovirus E1A-associated 300 kDa protein (p300) and luciferase. *Nucleic Acids Res.* 24, 3010-3016.
- Kawasaki, H., Ecker, R., Yao, T.-P., Taira, K., Chiu, R., Livingston, D. M. and Yokoyama, K. K. (1998) Distinct roles of the co-activators p300 and CBP in retinoic-acid-induced F9-cell differentiation. *Nature*, 393, 284-289.
- Kruger, K., Grabowski, P. J., Zaug, A. J., Sands, J., Gottschling, D. E. and Cech, T. R. (1982) Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell*, 31, 147-157.
- Lott, W. B., Pontius, B. W. and von Hippel, P. H. (1998) A two-metal ion mechanism operates in the hammerhead ribozyme-mediated cleavage of an RNA substrate, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 542-547.
- Murray, J. A. H. (ed.) (1992) *Antisense RNA and DNA*; Wiley-Liss, Inc. New York.
- Ohkawa, J., Yuyama, N., Takebe, Y., Nishikawa, S. and Taira, K. (1993) Importance of independence in ribozyme reactions: kinetic behavior of trimmed and of simply connected multiple ribozymes with potential activity against human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 11302-11306.
- Ojwang, J. O., Hampel, A., Looney, D. J., Wong-Staal, F. and Rappaport, J. (1992) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 expression by a hairpin ribozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 10802-10806.
- Ozawa, T., Tanaka, M., Ikebe, S., Ohno, K., Kondo, T. and Mizuno, Y. (1990) Quantitative determination of deleted mitochondrial DNA relative to normal DNA in parkinsonian striatum by a kinetic PCR

- analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 172, 483-489.
- Perriman, R., Bruening, G., Dennis E. S. and Peacock, W. J. (1995)
Effective ribozyme delivery in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 6175-6179.
- Pontius, B. W., Lott, W. B. and von Hippel, P. H. (1997) Observations on catalysis by hammerhead ribozymes are consistent with a two-divalent-metal-ion mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 2290-2294.
- Prisley, S., Buonomo, S. B. C., Michienzi, A. and Bozzoni, I. (1997) Use of adenoviral VAI small RNA as a carrier for cytoplasmic delivery of ribozymes. *RNA*, 3, 677-687.
- Rossi, J. J. and Sarver, N. (1990) RNA enzymes (ribozymes) as antiviral therapeutic agnts. *TIBTECH*, 8, 179-183.
- Rossi, J. J. (1995) Controlled, targeted, intracellular experssion of ribozymes: progress and problems. *TIBTECH*, 13, 301-306.
- Sarver, N., Cantin, E. M., Chang, P. S., Zaida, J. A., Ladne, P. A., Stepenes, D. A. and Rossi, J. J. (1990) Ribozymes as potential anti-HIV-1 therapeutic agents. *Science*, 247, 1222-1225.
- Scanlon, K. J. (ed.) (1997) *Therapeutic Applications of Ribozymes; Methods in Molecular Medicine*, Vol. 11, Humana Press, New Jersey.
- Shimada, T., Fujii, H., Mitsuya, H. and Niehuis, A. W. (1991) Targeted and highly efficient gene transfer into CD4+ cells by a recombinant human immunodeficiency virus retroviral vector. *J. Clin. Invest.*, 88, 1043-1047.
- Smith, D. W. and Weinberg, W. C. (1981) Transfer RNA in reticulocyte maturation. *Biochem. Biophys. Acta.*, 655, 195-198.
- Sullenger, B. A., Lee, T. C., Smith, C. A. and Ungers, G. E. (1990) Expression of chimeric tRNA-driven antisense transcripts renders NIH 3T3 cells highly resistant to Moloney murine leukemia virus

- replication. *Mol. Cell. Biol.* 10, 6512-6523.
- Sullenger, B. A. and Cech, T. R. (1993) Tetherying ribozymes to a retroviral packaging signal for destruction of viral RNA. *Science*, 262, 1566-1569.
- Taira, K., Nakagawa, K., Nishikawa, S. and Furukawa, K. (1991) Construction of a novel RNA-transcript-trimming plasmid which can be used both in vitro in place of run-off and (G)-free transcriptions and in vivo as multi-sequence transcription vectors. *Nucleic Acids Res.*, 19, 5152-5130.
- Thomas, K. R. and Capecchi, M. R. (1987) Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, 51, 503-512.
- Thompson, D. J., Ayers, F. D., Malmstrom, A. T., Ganousis, L. M., Chowrira, M. B., Couture, L. and Stinchcomb, T. D. (1995) Improved accumulation and activity of ribozymes expressed from a tRNA-based RNA polymerase III promoter. *Nucleic Acids Res.*, 23, 2259-2268.
- Tobian, J. A., Drinkard, L. and Zaseloff, M. (1985) tRNA nuclear transport: defining the critical regions of human tRNA Met by point mutagenesis. *Cell*, 43, 415-422.
- Turner, P. C. (ed.) (1997) *Ribozyme Protocols; Methods in Molecular Biology*, Vol. 74, Humana Press, New Jersey.
- Uhlenbeck, O. C. (1987) A small catalytic oligoribonucleotide. *Nature*, 328, 596-600.
- Yamada, O., Kraus, G., Leavitt, M. C., Yu, M. and Wong-Staal, F. (1994) Activity and cleavage site specificity of an anti-HIV-1 hairpin ribozyme in human T cells. *Virology*, 205, 121-126.
- Yamada, O., Yu, M., Yee, J.-K., Kraus, G., Looney, D. and Wong-Staal, F. (1994) Intracellular immunization of human T cells with a hairpin

ribozyme against human immunodeficiency virus type 1. Gene Therapy, 1, 38-45.

- Yates, J., Warren, N., Reisman, D. and Sugden, B. (1984) A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 3806-3810.
- Yu, M., Ojwang, J. O., Yamada, O., Hmapel, A., Rappaport, J., Looney, D. and Wong-Staal, F. (1993) A hairpin ribozyme inhibits expression of diverse strains of human immunodeficiency virus type 1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 6340-6344.
- Zhao, J.J. and Pick, K. (1993) Generating loss-of function phenotypes of the fushitarazu gene with a targated ribozyme in Drosophila. Nature, 365, 448-451.
- Zhou, D.-M., Zhang, L.-H., Kumar, P. K. R. and Taira, K. (1996) The ribozyme mechanism revisited: Evidence against direst coordination of a Mg^{2+} ion with the pro-Roxygen of the scissile phosphate in the transition state of a hammerhead ribozyme-catalyzed reaction. J. Am. Chem. Soc., 118, 8969-8970.
- Zhou, D.-M., Zhang, L.-H. and Taira, K. (1997) Explanation by the double-metal-ion mechanism of catalysis for the differential metal ion effects on the cleavage rates of 5'-oxy and 5'-thio substrates by a hammerhead ribozyme. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 14343-14348.
- Zhou, D.-M. and Taira, K. (1998) The hydrolysis of RNA: from theoretical calculations to the hammerhead ribozyme-mediated cleavage of RNA. Chem. Rev, 98m 991-1026.

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として明細書にとり入れるものとする。

請求の範囲

1. 下記の塩基配列(I) または(II)を持つヌクレオチド配列を含むリボザイム。

塩基配列(I): 5'-ACCGUUGGUUCCGUAGUGUAGUGGUUAUCACGUUCGCCUAACACGCGAAAGGUC
CCCGGUUCGAAACCGGGCACUACAAACACAACACUGAUGAGGACCGAAAGGUCCGAAACGGGCACGUCGGA
AACGGUUUUU-3'

塩基配列(II): 5'-ACCGUUGGUUCCGUAGUGUAGUGGUUAUCACGUUCGCCUAACACGCGAAAGGU
CCCCGGUUCGAAACCGGGCACUACAAACCAACACACAACACUGAUGAGGACCGAAAGGUCCGAAACGGGCA
CGUCGGAACGGUUUUU-3'

2. 請求項1記載のリボザイムをコードするDNAを含む発現ベクター。

3. 請求項1記載のリボザイムをコードするDNAを含む発現ベクターDNA
を鋳型として、RNAに転写することを特徴とする、請求項1記載のリボザイ
ムの製造方法。

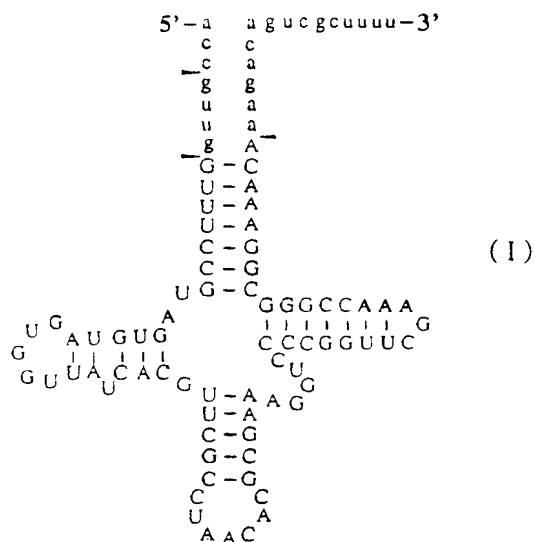
4. 請求項1記載のリボザイムまたは請求項2記載の発現ベクターを有効成分
として含む医薬組成物。

5. 後天性免疫不全症候群を予防および／または治療するための請求項4記載
の医薬組成物。

6. 請求項1記載のリボザイムを用いて、標的RNAを特異的に切断する方法。

7. 標的RNAがHIV-1 RNAである請求項6記載の方法。

8. 下記の二次構造(I)をとるRNAの改変体であって、二次構造(I)をとるRNAのヌクレオチド配列のヌクレオチド8～14およびヌクレオチド73～79の間で水素結合が形成される領域にバルジ構造が導入されていることを特徴とする前記RNA改変体。



9. 二次構造(I)をとるRNAのヌクレオチド配列中のヌクレオチド73～79の領域の配列の一部または全部を置換することにより、バルジ構造が導入されている請求項8記載のRNA改変体。

10. 配列番号1のヌクレオチド配列中のヌクレオチド1～80の領域の配列からなる請求項8記載のRNA改変体。

11. 配列番号2のヌクレオチド配列中のヌクレオチド1～86の領域の配列からなる請求項8記載のRNA改変体。

12. 請求項8記載のRNA改変体の3'末端に任意のRNA鎖が連結されているRNA。

13. 任意のRNA鎖が、リボザイムまたはアンチセンスRNAである請求項12記載のRNA。

14. 二次構造(I)をとるRNAのヌクレオチド配列中のヌクレオチド8～14の領域のいずれかのヌクレオチドおよび3'末端に連結されたRNA鎖のいずれかのヌクレオチドによってバルジ構造が形成される請求項12記載のRNA。

15. 請求項12記載のRNAをコードするDNAを含む発現ベクター。

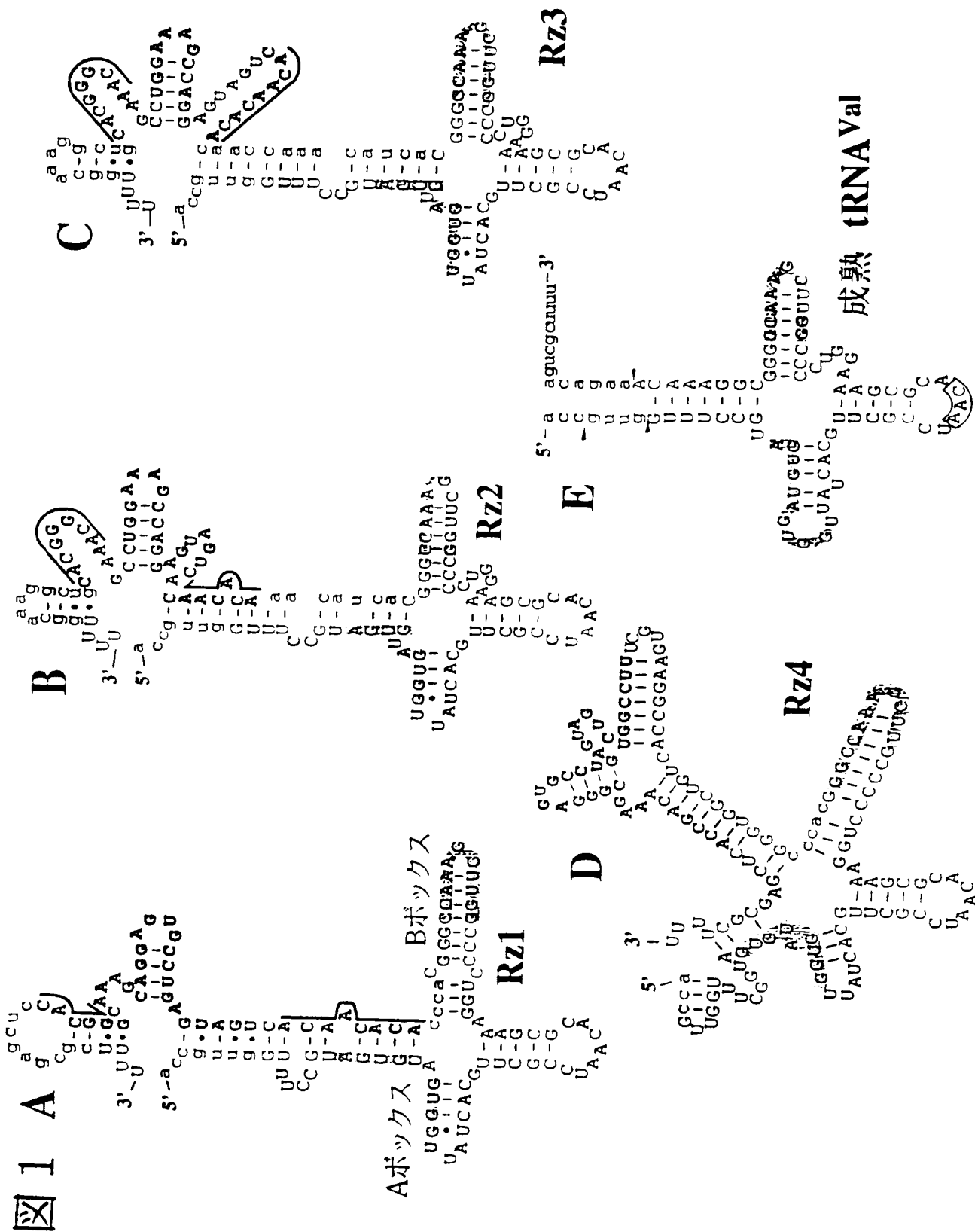
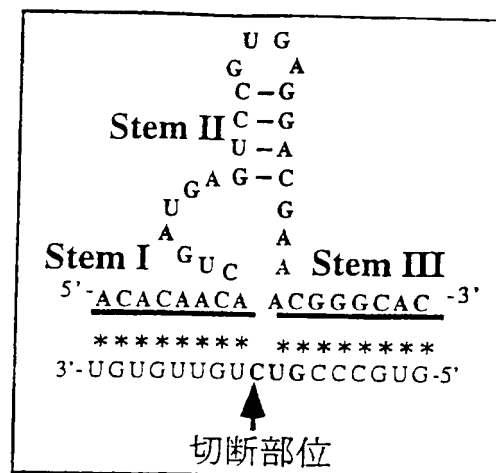
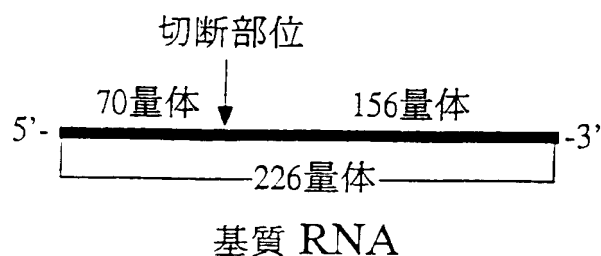




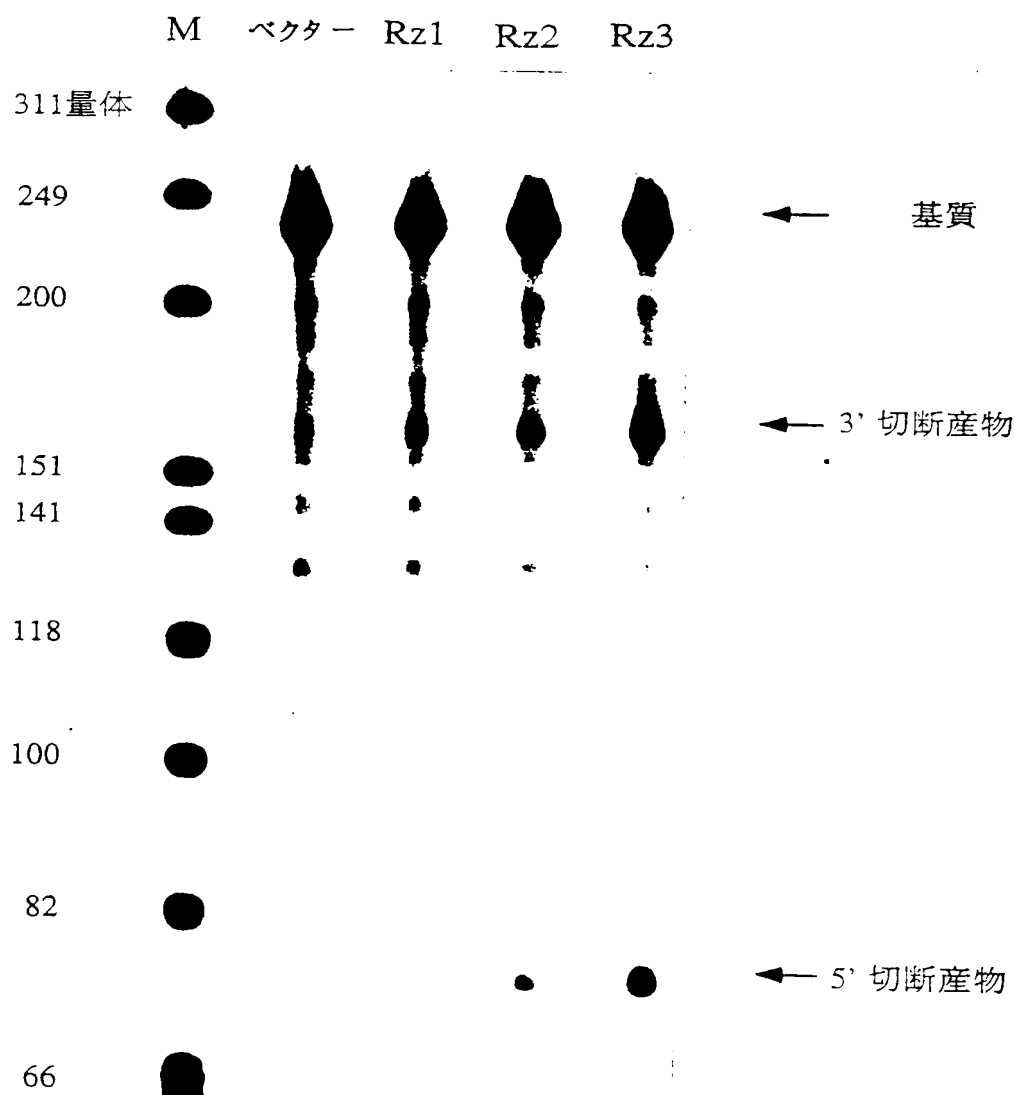
図 2

A



基質との結合 (2次予測図)

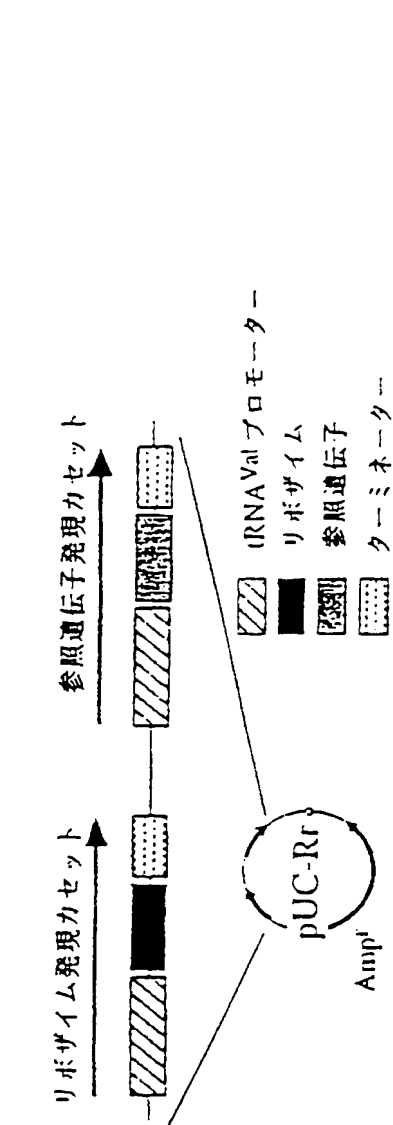
B



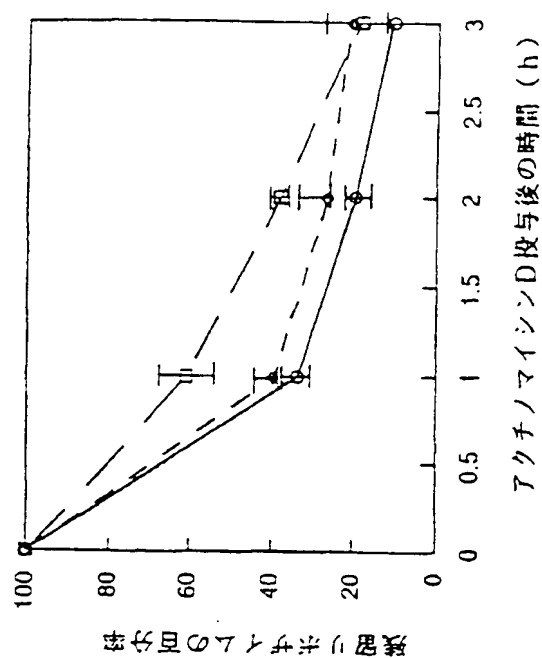
2 / 7



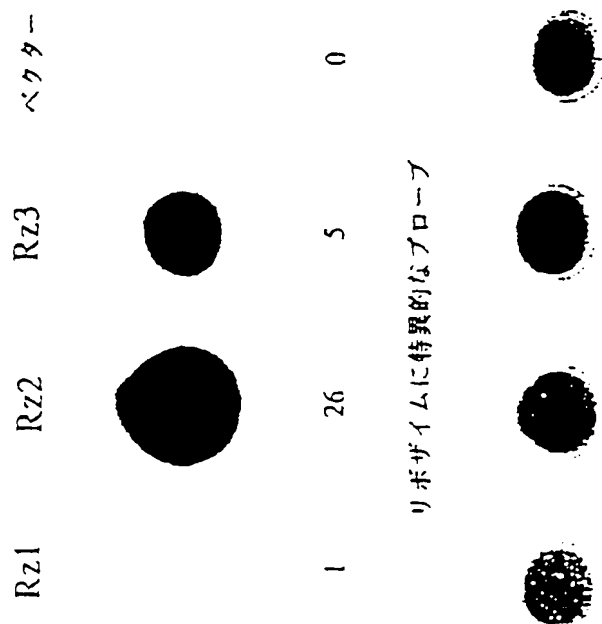
3



C



B





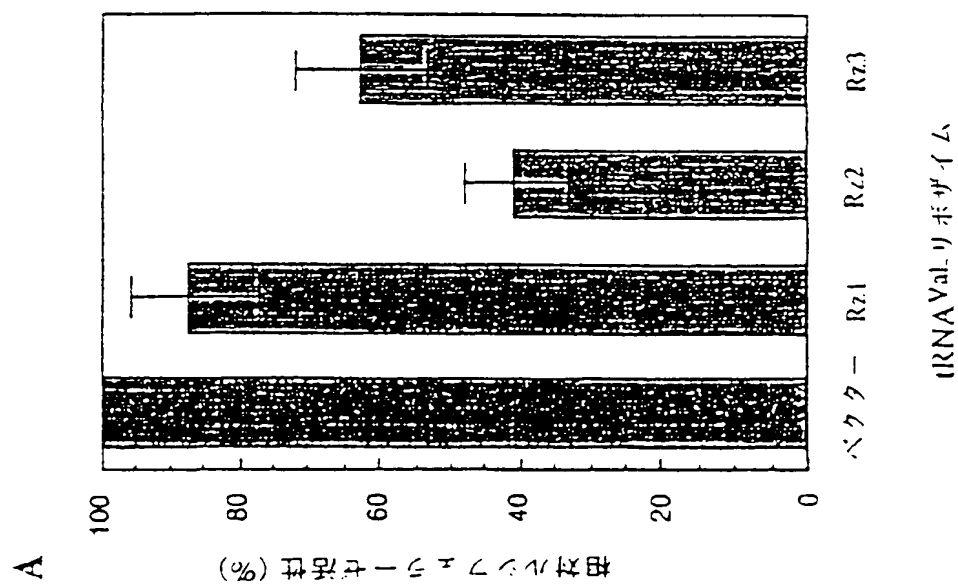
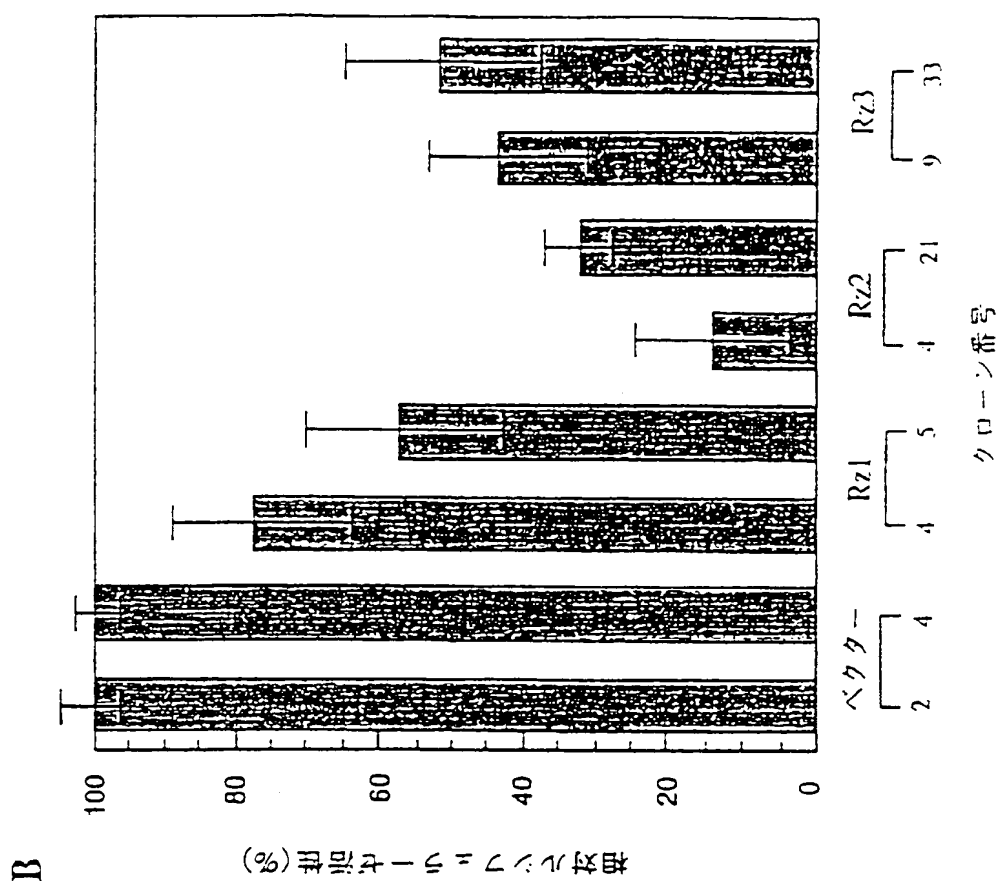


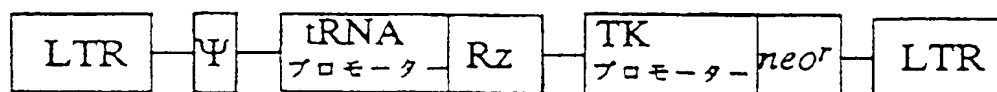


図 5

A



B





6

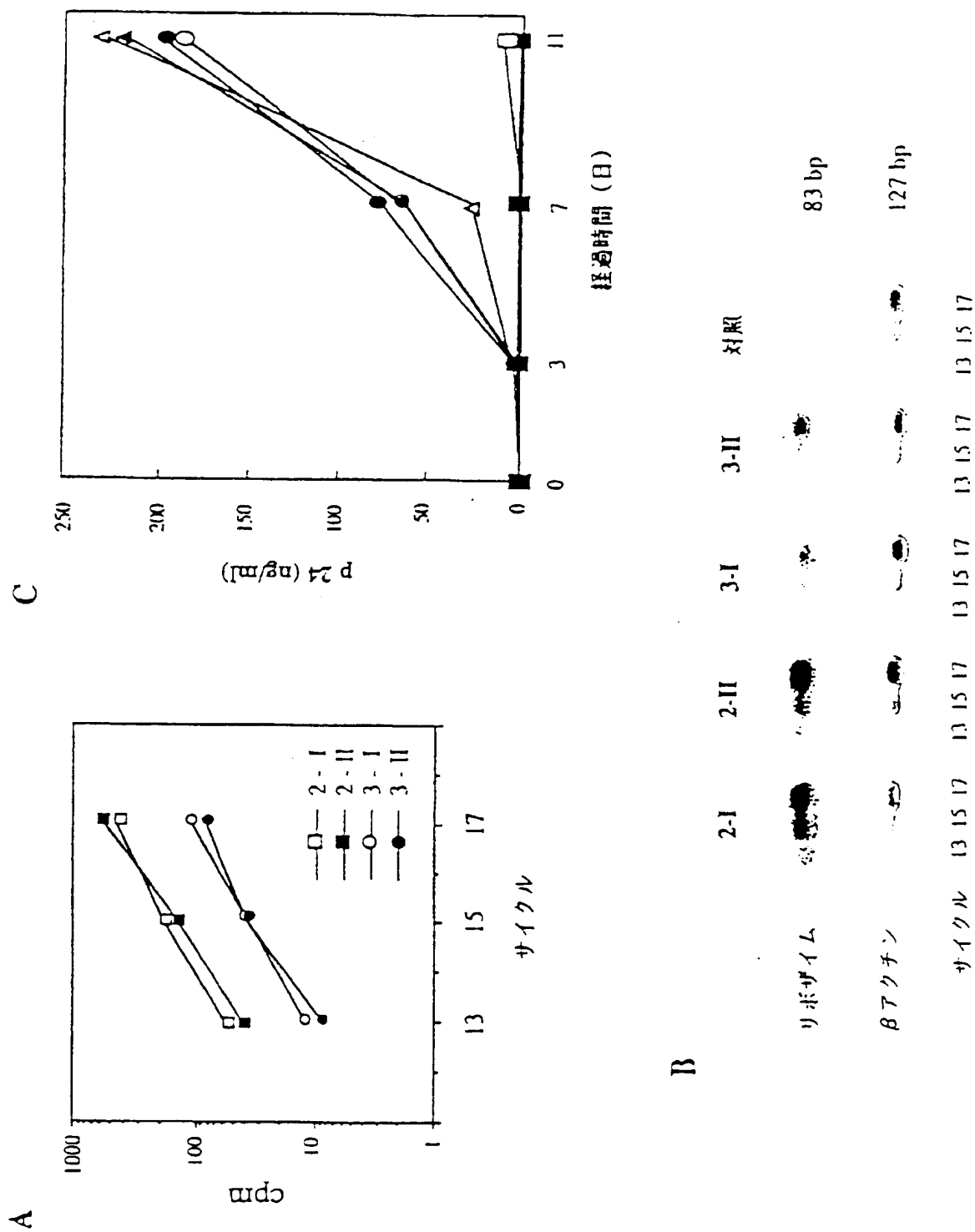
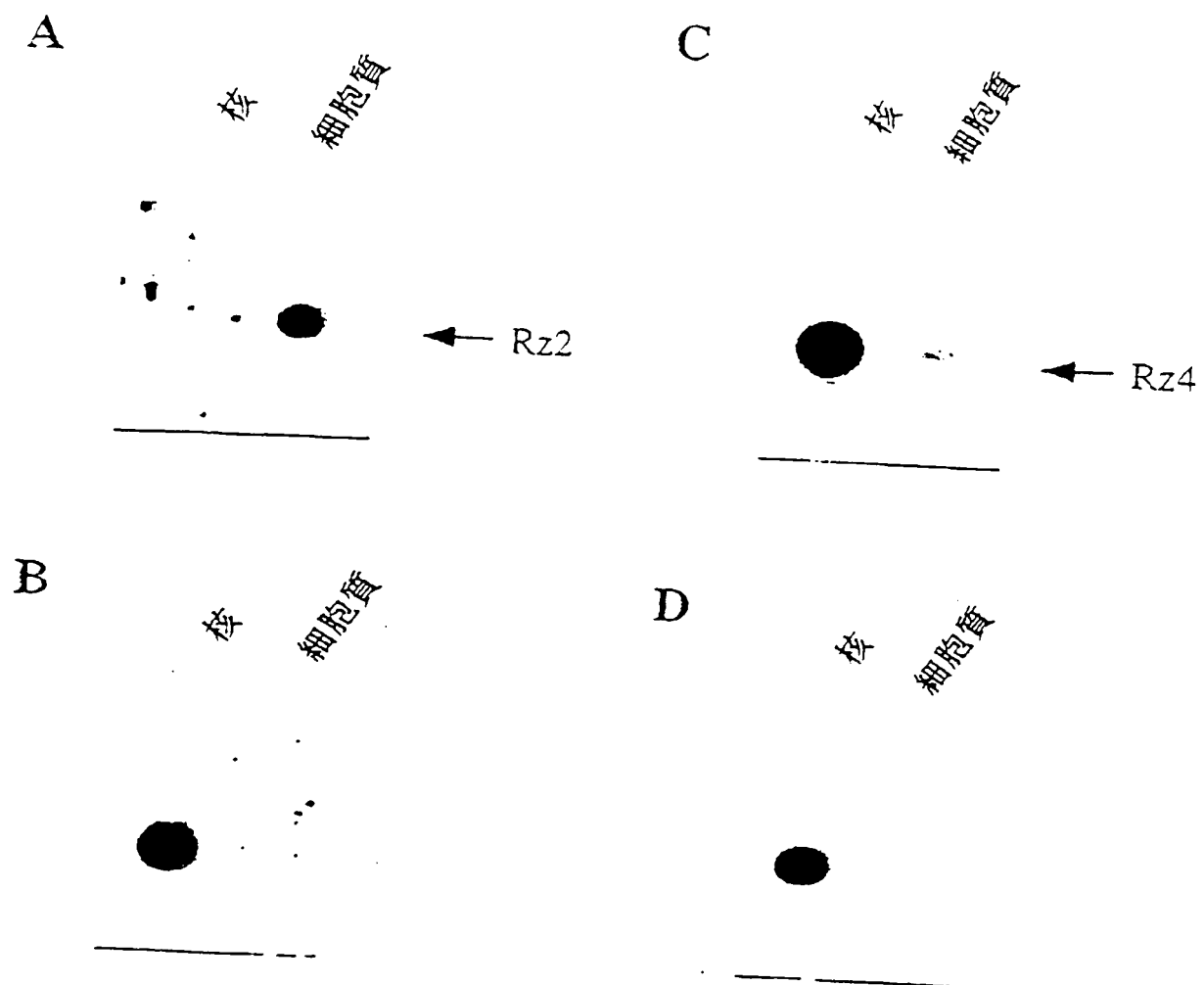




図 7





配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Director-General of Agency of Industrial Science and Technology

<120> Expression Systems for Transcription of Functional Nucleic Acids

<130> 117F0059

<140>

<141>

<160> 23

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 136

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the nucleotide
sequence of Rz2

<400> 1

accguugguu uccguagugu agugguuauc acguucgccu aacacgcgaa aggucccccgg 60



uucgaaaccg ggcacuacaa acacaacacu gaugaggacc gaaagguccg aaacgggcac 120
gucggaaacg guuuuu 136

<210> 2

<211> 142

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the nucleotide
sequence of Rz3

<400> 2

accguugguu uccguagugu agugguuauc acguucgccu aacacgcgaa aggucccccgg 60
uucgaaaccg ggcacuacaa accaacacac aacacugaug aggaccgaaa gguccgaaac 120
gggcacgucg gaaacgguuu uu 142

<210> 3

<211> 128

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the nucleotide
sequence of Rz1

<400> 3

accguugguu uccguagugu agugguuauc acguucgccu aacacgcgaa aggucccccgg 60



uucgaaaccg ggcacccaca caacacugau gaguccguga ggacgaaacg ggcaccucga 120
gcgcuuuu 128

<210> 4

<211> 95

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the nucleotide
sequence of the transcript of human placental tRNA^{Val}

<400> 4

accguugguu uccguagugu agugguuauc acguucgccu aacacgcgaa aggucccccgg 60
uucgaaaccg ggcggaaaca aagacagucg cuuuu 95

<210> 5

<211> 149

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the nucleotide
sequence of Rz4

<400> 5

accguugguu uccguagugu agugguuauc acguucgccu aacacgcgaa aggucccccgg 60
uucgaaaccg ggcacccggg uggcugucac cggaagugcu uuccggucuc augaguccgu 120



gagggcgaaa cagccacucg agcgcuuuu

149

<210> 6

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of a sense oligonucleotide linker

<400> 6

aattcaggac tagtctttta ggtcaaaaag aagaagcttt gtaaccgttg gtttcgtag 60
tgtagtggtt atcacgttcg cctaacacgc gaaagggtccc cggttcgaag 110

<210> 7

<211> 113

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of an antisense oligonucleotide linker

<400> 7

tgcacttcga accgggggacc tticgcgtgt taggcgaacg tgataaccac tacactacgg 60
aaaccaacgg ttacaaagct tcttcttctt ttgacctaa aagactagtc ctg 113



<210> 8

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of a sense oligonucleotide linker

<400> 8

cgaaaccggg caccgggga atataacctc gagegccttt ttctatcgc gtc 53

<210> 9

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of an antisense oligonucleotide linker

<400> 9

tcgacgcgat agaaaaaag cgctcgaggt tatattcccc gggcgcccg ttc 54

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of an upper primer

<400> 10

cgccaggggtt tcccagtcac gac

23

<210> 11

<211> 101

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of a lower primer including the sequences of Rzl
and a terminator

<400> 11

ctgcagggtcg acgcgataga aaaaaagcgc tcgaggtgcc cgtttcgtcc tcacggactc 60
atcagtgttg tgtgggtgcc cggtttcgaa ccggggacctt t 101

<210> 12

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence



of a lower primer including the sequences of Rz2
and a terminator

<400> 12

ctgcaggctg acgcgataga aaaaaaccgt ttcgacgtg cccgtttcgg tcctttcgg 60
cctcatcagt gttgtgtttg tagtgcccgg ttcgaaccg gggaccttt 109

<210> 13

<211> 106

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of a lower primer including the sequences of Rz3
and a terminator

<400> 13

ctgcaggctg acgcgataga aaaaaaccgt ttcgacgtg cccgtttcgg tcctcatcag 60
tgttgtgtgt tggttigttag tgcccggttt cgaaccgggg accttt 106

<210> 14

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence



of a probe specific for the reference RNA

<400> 14

aaatcgctat aaaaagcgct cgaggttatg ctccccgggt

40

<210> 15

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of a probe specific for the ribozyme

<400> 15

ctcatctgtg ttgtgt

16

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of a primer for b-actin

<400> 16

gtggccatct ctgtctcgaa

20



<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of a primer for the ribozyme

<400> 17

gacctttcgg tcttcac

18

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of an upper oligonucleotide primer

<400> 18

gactacctca tgaagatcct

20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of a lower oligonucleotide primer

<400> 19

gtggccatct ctgctcgaa

20

<210> 20

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of an upper oligonucleotide primer

<400> 20

gttatcacgt tcgcctaa

18

<210> 21

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of a lower oligonucleotide primer



<400> 21

gacctttcgg tcctcatc

18

<210> 22

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of a probe specific for the ribozyme

<400> 22

acgcgaaagg tccccggt

18

<210> 23

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of a probe specific for b-actin

<400> 23

gcgggaaaat cgtgcgtga

19



配列表フリーテキスト

配列番号 1 の配列は R z 2 の塩基配列である。

配列番号 2 の配列は R z 3 の塩基配列である。

配列番号 3 の配列は R z 1 の塩基配列である。

配列番号 4 の配列はヒト胎盤 tRNA^{Val} の転写物の塩基配列である。

配列番号 5 の配列は R z 4 の塩基配列である。

配列番号 6 の配列はセンスオリゴヌクレオチドリンカーの塩基配列である。

配列番号 7 の配列はアンチセンスオリゴヌクレオチドリンカーの塩基配列である。

配列番号 8 の配列はセンスオリゴヌクレオチドリンカーの塩基配列である。

配列番号 9 の配列はアンチセンスオリゴヌクレオチドリンカーの塩基配列である。

配列番号 10 の配列はアッパープライマーの塩基配列である。

配列番号 11 の配列は R z 1 とターミネーターの配列を含むロアープライマーの塩基配列である。

配列番号 12 の配列は R z 2 とターミネーターの配列を含むロアープライマーの塩基配列である。

配列番号 13 の配列は R z 3 とターミネーターの配列を含むロアープライマーの塩基配列である。

配列番号 14 の配列は参照 RNA に特異的なプローブの塩基配列である。

配列番号 15 の配列はリボザイムに特異的なプローブの塩基配列である。

配列番号 16 の配列は β -アクチン用のプライマーの塩基配列である。

配列番号 17 の配列はリボザイム用のプライマーの塩基配列である。

配列番号 18 の配列はアッパーオリゴヌクレオチドプライマーの塩基配列である。

配列番号 19 の配列はロアープライマーオリゴヌクレオチドプライマーの塩基配列である。

配列番号 20 の配列はアッパーオリゴヌクレオチドプライマーの塩基配列である。

配列番号 21 の配列はロアープライマーオリゴヌクレオチドプライマーの塩基配列である。

配列番号 22 の配列はリボザイムに特異的なプローブの塩基配列である。

配列番号 23 の配列は β -アクチンに特異的なプローブの塩基配列である。



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04718

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N15/00, C12N9/00, A61K31/00, A61K31/70, A61K35/76, A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N15/00, C12N9/00, A61K31/00, A61K31/70, A61K35/76, A61K48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Hiroaki K., et al., "Distinct roles of the co-activators p300 and CBP in retinoic-acid-induced F9-cell differentiation", Nature (May, 1998), Vol. 393, No. 6682, p. 284-289	1-15
A	Hiroaki K., et al., "Deletion of the best target site for ribozyme-mediated cleavage within a fusion gene for adenovirus E1A-associated 300kDa protein (p300) and luciferase", Nucleic Acids Research (1996), Vol. 24, No. 15, p.3010-3016	1-15
A	US, 5670361, A (The Regents of the University of California), 23 September, 1997 (23. 09. 97) (Family: none)	1-15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C
 ☐ See patent family annex

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 October, 1999 (27. 10. 99)

Date of mailing of the international search report
9 November, 1999 (09. 11. 99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl^{*} C12N 15/00, C12N 9/00, A61K 31/00, A61K 31/70, A61K 35/76, A61K 48/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl^{*} C12N 15/00, C12N 9/00, A61K 31/00, A61K 31/70, A61K 35/76, A61K 48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Hiroaki K., et al. "Distinct roles of the co-activators p300 and CBP in retinoic-acid-induced F9-cell differentiation", Nature(May, 1998), Vol.393, No. 6682, p. 284-289	1-15
A	Hiroaki K., et al. "Deletion of the best target site for ribozyme-mediated cleavage within a fusion gene for adenovirus E1A-associated 300kDa protein(p300) and luciferase", Nucleic Acids Research(1996), Vol. 24, No. 15, p. 3010-3016	1-15
A	US, 5670361, A (The Regents of the University of California) 23. 9月. 1997(23. 09. 97) (ファミリーなし)	1-15

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 10. 99

国際調査報告の発送日

09.11.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり

印

4 N

9152

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

